

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchungen zum Nachweis von natürlich vorkommenden
Autoantikörpern gegen polymerisiertes Humanserumalbumin

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt von

Markus M ü l l e r
aus Mainz

Mainz, ~~1985~~
1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554411_0010

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchungen zum Nachweis von natürlich vorkommenden
Autoantikörpern gegen polymerisiertes Humanserumalbumin

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt von

Markus M ü l l e r
aus Mainz

Mainz, 1983

Dekan: Prof. Dr. J. Michaelis

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. K.-H. Meyer zum Büschenfelde

2. Gutachter: Prof. Dr. T. Hütteroth

Tag der Promotion: 5. Juni 1985

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	4
2.1	Tierversuche	4
2.1.1.	Herstellung der monomeren und polymeren Albumine	4
2.1.2.	Immunisierung der Tiere	7
2.1.3.	Nachweis der Antikörper	8
2.1.3.1.	Passive Hämagglutination	8
2.1.3.2.	Immndiffusion nach Ouchterlony	9
2.1.3.3.	Inhibitions- und Absorptionsversuche	10
2.2.	Humanseren	11
2.2.1.	Charakterisierung des Kontrollkollektivs	11
2.2.2.	Charakterisierung des Patientenkollektivs	12
2.2.3.	Teste zum Nachweis der Bindungsaktivität von Humanseren mit polymerisierten Albuminen	14
2.2.3.1.	Passive Hämagglutination	14
2.2.3.2.	Immndiffusion nach Ouchterlony	15
2.2.3.3.	Inhibitionsversuche	16
3.	Ergebnisse	17
3.1.	Tierversuche	17
3.1.1.	Optimierung der passiven Hämagglutination	17
3.1.2.	Nachweis von Antikörpern gegen monomere und polymere Albumine	18
3.1.2.1.	Passive Hämagglutination	18
3.1.2.2.	Inhibitionsversuche	22
3.1.2.3.	Immndiffusion nach Ouchterlony	23
3.2.	Humanseren	25
3.2.1.	Optimierung der passiven Hämagglutination	25
3.2.2.	Reaktion von Humanseren mit polymeren Albuminen	27
3.2.2.1.	Das Kontrollkollektiv	27
3.2.2.2.	Das Patientenkollektiv I	30
3.2.2.3.	Das Patientenkollektiv II	40
4.	Diskussion	42
5.	Zusammenfassung	52
6.	Liste der Abkürzungen	54
7.	Literaturverzeichnis	56

1. Einleitung

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigten sich mit der Bindungsaktivität von Patientenseren für polymerisiertes Humanserumalbumin (pHSA) (Matuhasi and Hosokawa, 1972; Lenkei et al., 1974; Milich et al., 1980). Polymerisiertes Humanserumalbumin kann in niedriger Konzentration physiologisch bei Normalpersonen nachgewiesen werden, in verstärktem Maße jedoch bei Patienten mit Leberfunktionsstörungen (Lenkei et al., 1974). Anfangs wurden nur zirkulierende Autoantikörper gegen das pHSA als mögliche Reaktionspartner diskutiert (Lenkei et al., 1974). Bei akuter und chronischer Hepatitis B wurde die pHSA-Bindungsaktivität auf das Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) bezogen (Hansson and Purcell, 1979; Imai et al., 1979; O'Neill, 1979). Neuerdings hat man sogar die Bindungsfähigkeit von humanem C1q für pHSA nachgewiesen (Milich, 1980 und 1981 a und b).

Die Existenz eines Rezeptors auf dem HBsAg-Partikel für pHSA steht mittlerweile außer Frage. Er ist spezies-spezifisch, das heißt, er reagiert nur mit pHSA, nicht aber mit polymerisiertem Albumin anderer Spezies und dürfte von Proteinatur sein, da er durch proteolytische Enzyme abgebaut werden kann (Imai et al., 1979). Pathogenetische Bedeutung erlangt der Rezeptor unter Umständen durch die Tatsache, daß eine vergleichbare Bindungsstelle für pHSA kürzlich auch auf der Hepatozytenoberfläche des Menschen nachgewiesen werden konnte; diese Bindungsstelle auf humanen Leberzellen ist nicht spezies-spezifisch und unterscheidet sich darin von der des Hepatitis-B-Virus assoziierten Rezeptors für pHSA (Trevisan et al., 1982; Thung and Gerber, 1983 b). Polymerisiertes Humanserumalbumin könnte möglicherweise die Funktion eines Verbindungsgliedes zwischen dem HBsAg-Partikel bzw. dem intakten Hepatitis-B-Virus (Dane-Partikel) und dem Hepatozyten innehaben. Somit könnte die strenge Wirtsbezogenheit infolge des spezies-spezifischen Rezeptors ausschließlich durch das Virus bestimmt sein, der Organotropismus jedoch durch die Leberzelloberfläche (Imai et al., 1979; Thung and Gerber, 1981; Trevisan et al., 1982).

Die physiologische Funktion der Bindungsstelle für pHSA auf der Hepatozytenmembran wird in der Kopplung und anschließenden Metabolisierung der polymerisierten Albuminmoleküle gesehen, die durch Alterungsprozeß entstehen (Lenkei et al., 1977 b; Lenkei and Ghetie, 1977 c). Es hat sich gezeigt, daß gealtertes Albumin im Vergleich zum glutaraldehydbehandelten in der Immundiffusion immunologisch identisch reagiert (Onica et al., 1978 b; Lenkei, 1980 a). In vitro läßt sich daher dieser Alterungsprozeß von Albuminen durch Glutaraldehyd-Behandlung beschleunigt nachvollziehen (Onica et al., 1978 a und b).

Im Gegensatz zum HBsAg assoziierten Rezeptor für pHSA ist es noch umstritten, ob zusätzlich Autoantikörper gegen pHSA in vivo auftreten. Umsomehr besteht Unklarheit über ihre mögliche pathogenetische Bedeutung. Einerseits sollen sie bis zu einem bestimmten Spiegel schon bei Normalpersonen vorkommen (Lenkei and Ghetie, 1977 c; Mihăescu et al., 1981), andererseits in erhöhtem Maße bei Patienten mit Lebererkrankungen, vor allem bei solchen mit chronischem Verlauf (Lenkei et al., 1981). Es wird diskutiert, ob der reduzierte Katabolismus von pHSA, durch eine Leberzellinsuffizienz bedingt, zur Induktion von Autoantikörpern gegen pHSA führt (Lenkei and Ghetie, 1977 c; Lenkei et al., 1981).

Die Koinzidenz von HBsAg assoziiertem Rezeptor und den pathologischen Anti-Albumin-Antikörpern (AAA) führt zu methodischen Problemen. Zur Unterscheidung kann die unterschiedliche Spezies-Spezifität herangezogen werden. Während der Rezeptor, wie schon oben erwähnt, spezies-spezifisch ist, findet bei AAA eine Kreuzreaktion mit polymerisierten Albuminen anderer Spezies statt. Inhibitionsexperimente lassen somit einen Unterschied zwischen Rezeptor einerseits und Autoantikörper andererseits erkennen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die pHSA-Bindungsaktivität von Patientenseren mit der passiven Hämagglutination und der Immundiffusion nach Ouchterlony untersucht. Es sollte am eigenen Patientengut und einem ausgewählten Kontrollkollektiv

die Existenz der AAA unabhängig vom HBsAg assoziierten pHSA-Rezeptor überprüft und gegebenenfalls eine Aussage hinsichtlich ihrer Spezifität für Lebererkrankungen getroffen werden. Ferner wurde im Tierversuch überprüft, ob durch Immunisierung mit polymeren Albuminen Antikörper erzeugt werden können, die mit Determinanten reagieren, die nur auf pHSA, nicht jedoch auf monomerem Humanserumalbumin exprimiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Tierversuche

Für die Tierexperimente wurden vier Kaninchen mit je einem der vier Antigene:

- monomeres Humanserumalbumin (mHSA)
- polymeres " (pHSA)
- monomeres Rinderserumalbumin (mBSA)
- polymeres " (pBSA)

immunisiert.

2.1.1. Herstellung der monomeren und polymeren Albumine.

Die Polymerisation von käuflichem Humanserumalbumin (HSA) und Rinderserumalbumin (BSA) erfolgte nach der Methode von Lemieux et al., 1974.

Je 100 mg HSA (Behringwerke ORHA 20/21) bzw. 100 mg BSA (Behringwerke ORHD 20/21) wurden in 9 ml 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 6,8, aufgelöst. Je 1 ml 2,5% iges Glutaraldehyd (Sigma G-5882) wurde unter ständigem Rühren tropfenweise hinzugefügt. Die Polymerisation war bei Raumtemperatur nach zwei Stunden abgeschlossen, die vormals fast farblose klare Albuminlösung hatte nun einen gelbbraunen Farbton angenommen.

Die sich anschließende Dialyse diente zur Entfernung des freien Glutaraldehyds. Dazu wurde das polymerisierte HSA bzw. BSA in einen Dialyseschlauch (Visking-Dialysierschlauch, Serva, Heidelberg) gefüllt. Die Dialyse erfolgte gegen 0,01 M PBS, pH 7,5 bei 4°C über drei Tage hinweg. Die Dialyseflüssigkeit wurde täglich erneuert.

Die Trennung des polymerisierten Albumingemisches in poly-, oligo- und monomere Fraktionen geschah mit Hilfe der Gelfiltration. Verwendet wurde eine 100 cm lange und 3 cm im Querschnitt messende Glassäule. Gelpulver Sephadex G 200 (Pharmacia Lot. No. 6175) wurde in Tris-Puffer pH 8,0 aufgelöst. Nach einer

Quellungszeit bei Raumtemperatur von 72 Stunden und zwischenzeitlich wiederholtem Pufferwechsel, wurde das Gel blasenfrei 90 cm hoch in die Glassäule eingefüllt. Zum Absetzen des Gels wurde die Säule über 24 Stunden mit Tris-Puffer pH 8,0 gespült.

10 ml des Gemisches von polymerisiertem HSA bzw. BSA wurden auf die Säule aufgetragen. Eluiert wurde mit Tris-Puffer pH 8,0, Durchflußrate 30 ml/Stunde. Die Transmission wurde bei 280 nm als Maß für den Proteingehalt mit Hilfe eines Aufzeichnungsgerätes (LKB 8300 Uvicord II) kontinuierlich im Verlauf der Auftrennung registriert (Abb. 1), das Eluat gleichzeitig in Fraktionen von 90 Tropfen in je einem Röhrchen aufgefangen.

Nach Auswertung der automatischen Aufzeichnung wurden mehrere Röhrchen zur poly- bzw. monomeren Fraktion gepoolt, das dazwischen aufgefangene Eluat, das hauptsächlich Oligomere enthielt, verworfen.

Nach dem Abfüllen der beiden Fraktionen in Dialyseschläuche wurde eine Einengung des Volumens solange vorgenommen, bis Proteinkonzentrationen von ca. 10 mg/ml erreicht waren. Die Einengung erfolgte mit Dextran T 70 Puder (Pharmacia GB 19164).

Die sich anschließende Dialyse gegen 0,01 M PBS, pH 7,5 wurde über drei Tage hinweg bei 4°C fortgesetzt. Auch dabei wurde die Dialyseflüssigkeit wieder mehrmals gegen frischen PBS-Puffer ausgetauscht.

Die Proteinkonzentration wurde nach Lowry et al., 1951 bestimmt.

Die gewonnenen Fraktionen mit mHSA bzw. pHSA (bzw. mBSA und pBSA) wurden abschließend bezüglich ihres Reinheitsgrades in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese überprüft (siehe Abb. 1). Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele in 1% iger wäßriger Coomassie-Blau-Lösung eine Stunde lang gefärbt und anschließend in 12,5% iger Trichloressigsäure solange entfärbt, bis die Banden deutlich sichtbar wurden. Die Aufbewahrung der Gele erfolgte in destilliertem Wasser.

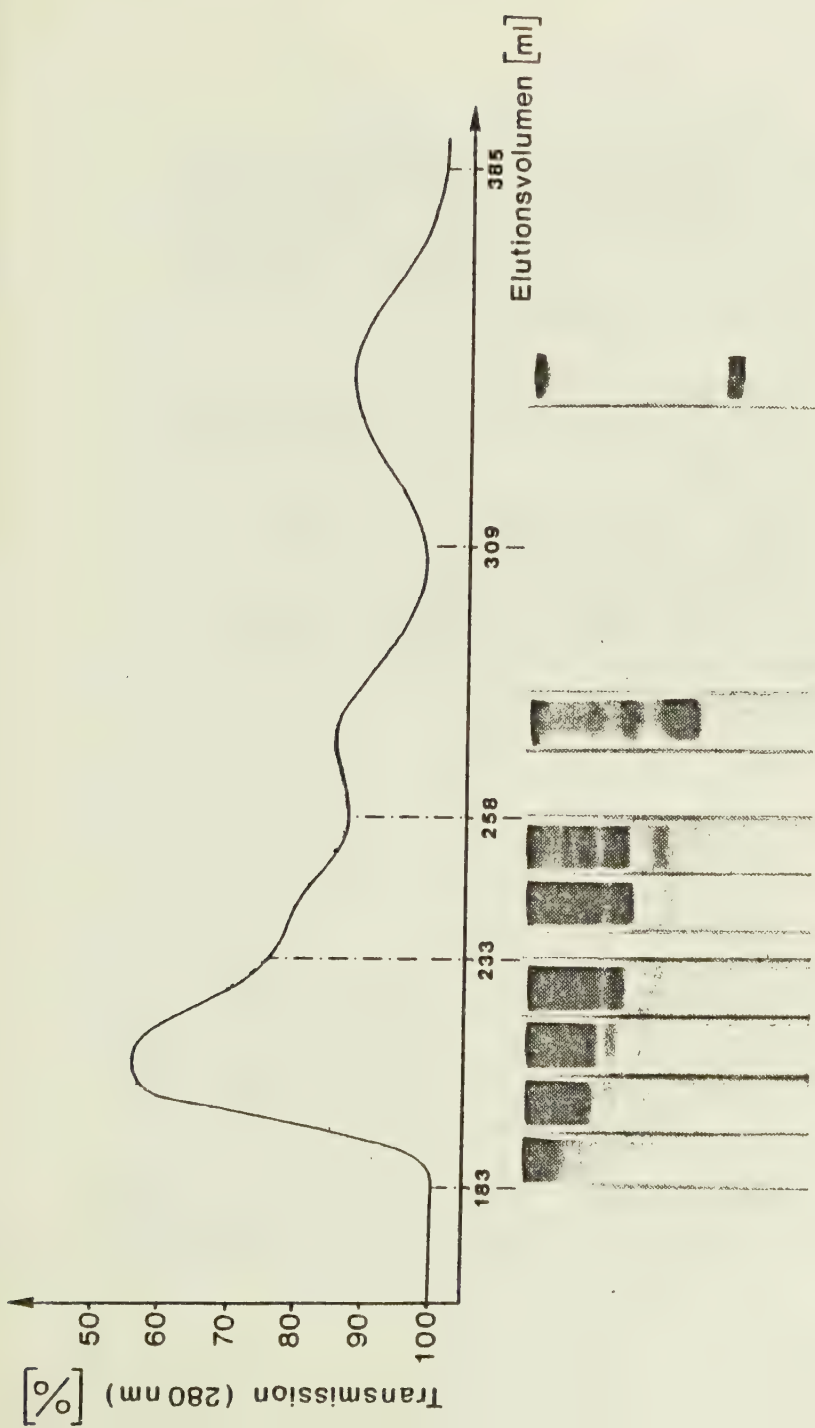


Abb. 1
Aufzeichnung einer chromatographischen Trennung der mHSA- und pHSA-Fraktion von glutaraldehydbehandeltem HSA. Nachweis des Reinheitsgrades der einzelnen Fraktionen durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

2.1.2. Immunisierung der Tiere

Zur Herstellung der Antiseren wurden vier ungefähr zwei Kilogramm schwere Kaninchen in einer Kurzzeitimmunisierung mit je einem der vier hergestellten und auf ihre Reinheit überprüften Antigene mHSA, pHSA, mBSA und pBSA geimpft. Jedem Kaninchen wurden vor der Immunisierung circa 5 ml Blut zur Gewinnung des Präserums für Kontrollexperimente abgenommen.

Die Immunisierung erfolgte in wöchentlichem Abstand mit je 5 mg Antigen, das zu gleichen Teilen mit Freund's complete Adjuvant (Difco Laboratories, MI) gemischt wurde, durch subcutane Impfung.

In Abständen von 21 und 26 Tagen nach der Erstimpfung wurde bei jedem Kaninchen eine Blutentnahme vorgenommen und der Antikörpertiter im Ouchterlony-Test nachgewiesen. Eine Woche nach der 4. Impfung war der Antikörpertiter ausreichend, die Kaninchen wurden unter Vollnarkose durch Herzpunktion entblutet. Das gewonnene Serum wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.1.3. Nachweis der Antikörper

Der Nachweis der Antikörper gegen mISA, pHSA, mBSA und pBSA erfolgte durch zwei verschiedene Verfahren, zum einen durch die passive Hämagglutination, zum anderen durch den schon oben erwähnten Ouchterlony-Test.

2.1.3.1. Die passive Hämagglutination

Die passive Hämagglutination wurde nach einer veränderten Technik nach Boyden, 1950 und Steffen, 1968 durchgeführt. 10 ml konservierte Hammelerythrozyten (Behringwerke ORAW 30/31) wurden mit der vierfachen Menge des weiter unten beschriebenen Puffers, pH 8,0, gewaschen und anschließend 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Die verwendete Zentrifuge war Rotanta/K, Hettich. Der Vorgang wurde viermal wiederholt und danach eine 50% ige Erythrozyten-Aufschwemmung im gleichen Puffer hergestellt.

Gleiches Volumen an Tanninsäurelösung wurde zu den Erythrozyten gegeben. Der weiter unten beschriebene Tanninsäure-Stock wurde dazu mit dem Puffer 1:400 verdünnt. Es schloß sich eine 15 Minuten dauernde Inkubationszeit im Wasserbad bei 37°C an. Darauf wurden die Erythrozyten in Puffer gewaschen und 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Vorgang wurde wiederum viermal wiederholt und danach eine 20% ige Erythrozyten-Aufschwemmung mit dem gleichen Puffer bereitet.

Nun wurde ein gleiches Volumen an Antigenlösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml hinzugefügt und 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Als Antigene wurden die gereinigten monomeren und polymeren Albuminfraktionen, als Negativkontrolle statt der Antigenlösung gleiches Volumen an Puffer zugesetzt. Nach der Inkubationszeit erfolgte zweimaliges Waschen in Pufferlösung, welche 1% inaktiviertes Normalkaninchenserum (NKS) enthielt, und Zentrifugieren bei 3000 rpm 5 Minuten lang. Anschließend wurde eine 1% ige Endkonzentration der beschichte-

ten Hammelerythrozyten mit 1% inaktiviertem NKS enthaltendem Puffer eingestellt.

Die Kaninchenserum wurden bei 56°C über 30 Minuten inaktiviert. Daran anschließend wurde von ihnen auf einer Mikrotiterplatte mit Rundböden (PS-Mikrotiterplatte 96 K, U-Form, Greiner, Art. Nr. 650101) eine Verdünnungsreihe hergestellt. Jede Serumprobe der Verdünnungsreihe wurde nun gegen jedes Antigen getestet, indem man das jeweilig beschichtete Blut zum Serum gab. Eine Spontanagglutination der beschichteten Hammelerythrozyten wurde durch Zugabe von reinem Puffer ausgeschlossen. Nach 1- und 24-stündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Ergebnis abgelesen.

Puffer für die passive Hämagglutination:

Natriumhydrogenphosphat	8,04 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,46 g
Natriumchlorid	0,60 g
Aqua dest.	ad 100,0 ml

Einstellung des Puffers auf pH 8,0

Vor Gebrauch wird der Puffer 1:8 mit Aqua dest. verdünnt.

Tanninsäure-Stock:

Tanninsäure	1,0 g
Aqua dest.	ad 100,0 ml

2.1.3.2. Immundiffusion nach Ouchterlony

Es wurde die Immundiffusion nach Ouchterlony, 1958, in einer abgeänderten Form verwendet.

In PBS-Puffer 0,01 M, pH 7,5, wurde ein 1% iges Agarosegel hergestellt. Je 2 ml flüssiges Gel wurden auf einen Objektträger gegossen und erstarren lassen. Nach einstündiger Aufbewahrung der Gele in einer feuchten Kammer, wurden vier Löcher mit einem Durchmesser von 3 mm um ein zentrales Loch angestanz.

Das zentrale Loch wurde mit 10 µl von unverdünntem Serum eines der vier geimpften Kaninchen gefüllt, die vier außen liegenden

Löcher enthielten je 10 µl der vier hergestellten Antigene mHSA, pHSA, mBSA und pBSA in einer Konzentration von 1 mg/ml. Antigene und Antikörper diffundierten über 48 Stunden lang in das Gel. Anschließend wurden die Gele für die Dauer von einer Stunde in Aqua dest. gewässert und darauf die Präzipitationsbanden in einer Zeichnung festgehalten. Nach Trocknung und abschließender Färbung der gebildeten Präzipitationsbanden mit Azocarmin (Scheidegger, 1955), wurde das Ergebnis ein zweites Mal abgelesen. Da die Ergebnisse des ersten und zweiten Ablesens gleich waren, wird im weiteren Verlauf zwischen den beiden nicht unterschieden.

2.1.3.3. Inhibitions- und Absorptionsversuche

Die Spezifität der Albuminbindung wurde durch Hämagglutination-Inhibition geprüft. Es wurden dazu pHSA und pBSA verwendet. Zu diesem Zweck wurden die Endpunkt-Verdünnungen der Seren mit dem Antigen in einer Serienverdünnung beginnend bei einer Albuminkonzentration von 1 mg/ml bei Zimmertemperatur für 24 Stunden inkubiert. Die stärkste Albuminverdünnung, die noch eine deutliche Inhibition der Hämagglutination zeigte, wurde notiert.

Ein weiteres Verfahren war die Absorption der vier Antisera mit HSA und BSA. Je ein Milliliter Kaninchenserum wurden mit 25 mg HSA bzw. BSA (lyophilisiert) für 1/2 Stunde bei 37°C und danach über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Seren wurden anschließend zentrifugiert und der Überstand in der passiven Hämagglutination und Immundiffusion getestet.

2.2. Humanseren

2.2.1. Charakterisierung des Kontrollkollektivs

Das Kontrollkollektiv I setzte sich aus 68 männlichen und 40 weiblichen Probanden in einem Altersbereich von 15 bis 73 Jahren zusammen ($\bar{m} = 26,9 \pm 8,5$).

Durch Radioimmunoassay (RIA) wurde das Vorhandensein von HBsAg, HBeAg, sowie die Antikörper gegen das Hepatitis-B-Virus anti-HBs, anti-HBc, anti-HBe und die Antikörper gegen das Hepatitis-A-Virus anti-HAV-IgG und IgM ausgeschlossen. Die Seren der Probanden waren fernerhin frei von Rheumafaktor, getestet durch den Rheumafaktor-Latex-Test (Behringwerke), sowie frei von anti-mitochondrialen Antikörpern (AMA), anti-nukleären Antikörpern (ANA) und Antikörpern gegen glatte Muskulatur (SMA), überprüft durch einen Immunfluoreszenztest. Ein Ausschluß von Antikörpern gegen Schilddrüsengewebe (TAK und MAK) wurde durch einen indirekten Hämagglutinationstest (Mast Diagnostica, Hamburg) durchgeführt.

Alle Seren der Probanden wurden nach Lagerung bei -20°C und anschließendem Auftauen in der passiven Hämagglutination und in der Immundiffusion getestet, vierzehn von ihnen zusätzlich nach der Blutentnahme und durchgeführter Serumgewinnung.

69 weitere Seren wurden dem Kontrollkollektiv II zugeordnet und hinsichtlich ihres pHSA-Bindungsvermögens nach Aufbewahrung bei -20°C und Auftauen ebenfalls in der passiven Hämagglutination und Immundiffusion nach Ouchterlony getestet. Bei diesem Kollektiv bestand anamnestisch kein Hinweis auf eine bestehende akute oder chronische Lebererkrankung. Durch RIA konnte jedoch ein Antikörpertiter gegen das Hepatitis-A-Virus (anti-HAV) in 46 Fällen, gegen das Hepatitis-B-Virus (anti-HBs, anti-HBc, oder beides) 7-mal, gegen beide Viren in 9 Seren nachgewiesen werden. Bei einer Person war Rheumafaktor festzustellen, bei insgesamt sechs Personen Antikörper gegen mikrosomales Antigen der Schilddrüse (MAK).

2.2.2. Charakterisierung des Patientenkollektivs

Das Patientenkollektiv I (PK I) bestand insgesamt aus 390 Seren. Diese Seren waren bei -20°C aufbewahrt worden. Von diesen entfielen 27 auf Seren von Patienten mit Lupus erythematoses disseminatus (LED), 32 rheumatoide Arthritiden (RA), 17 Glomerulonephritiden (GN) und 16 auf eine heterogen zusammengesetzte Gruppe von primär nicht hepatischen Immunerkrankungen (PNHI). Letztere Gruppe enthielt je 3 Patienten mit M.Crohn und M.Reiter, 2 mit Kollagenosen unklarer Genese und je 1 Patient mit Polychondritis, Arteritis temporalis, Vasculitis, Wegnersche Granulomatose, autoimmune hämolytische Anämie, primäres Raynaud-Syndrom, Myasthenia gravis und Sjögren-Syndrom.

298 Seren waren von Patienten mit Lebererkrankungen:

1. Von den akuten Virushepatitiden (AVH) entfielen 3 auf Virushepatitis A (VHA), 27 auf Virushepatitis B (VHB) und 14 auf eine nicht-A nicht-B Hepatitis (NANB).
2. 9-mal war die Diagnose einer protrahierten NANB-Virushepatitis (p.NANB) gestellt worden. Diese Gruppe war notwendig geworden, da zum Teil keine zweite Histologie einer Leberbiopsie innerhalb eines halben Jahres gemacht worden war, oder die Pathohistologie keine eindeutige Zuordnung nach De Groote et al., 1968, zuließ.
3. 5 Patienten waren als sogenannte gesunde HBsAg-Träger diagnostiziert worden (GT).
4. Die Gruppe der chronisch aktiven Hepatitiden (CAH) umfaßte 43 HBsAg-positive Hepatitiden, 24 CAH mit einer NANB als Ursache, 15 autoimmune (autoim.) CAH und 17 CAH unbekannter Genese (u.G.).
5. Auf Cirrhosen (Ci) entfielen 13 HBsAg-positive Patientenserum, 23 auf alkohol-toxischer Basis (alk.-tox.) und 18 auf Cirrhosen mit unbekannter Genese (u.G.).
6. Insgesamt 42 Seren stammten von Patienten mit einer primär biliären Cirrhose (PBC).

7. Bei 20 Patienten wurde die Diagnose "toxischer Parenchymschaden" (TP) gestellt.
8. Eine extrahepatische Cholestase (Ch) lag 7-mal vor.
9. Die letzte Gruppe umfaßte 18 Seren mit der Diagnose "Fettleber" (FL).

Das Patientenkollektiv II (PK II) zählte 92 frische Seren, die unmittelbar nach der Blutentnahme gewonnen und in der Immunodiffusion nach Ouchterlony getestet worden waren. Ein Einfrieren fand im Gegensatz zum vorher beschriebenen Kollektiv nicht statt. 15 akute Hepatitis B, 12 akute Hepatitis NANB, 15 HBsAg-positive CAH, 11 CAH nach NANB, 4 autoimmune CAH und 7 CAH unklarer Genese wurden getestet.

Je 4 Seren entfielen auf HBsAg-positive Cirrhosen und Cirrhosen auf alkohol-toxischer Basis, je 1 Serum auf eine autoimmune Form und PBC, sowie 6 auf Cirrhosen unklarer Genese. 2 Seren waren von sogenannten gesunden HBsAg-Trägern, 10 von Patienten mit toxischem Leberparenchymschaden.

2.2.3. Teste zum Nachweis der Bindungsaktivität von Humansenen mit polymerisierten Albuminen.

2.2.3.1. Die passive Hämagglutination

Die passive Hämagglutination wurde nach einer abgeänderten Technik nach Imai et al., 1979 und Steffen, 1968 durchgeführt. 10 ml Humanblut der Blutgruppe O Rh positiv wurden mit 10 ml Alselver und 8 ml 10% ige Formaldehyd gemischt und bei 37°C 1 1/2 Stunden im Wasserbad unter ständigem Schütteln inkubiert. Die formaldehydbehandelten Erythrozyten wurden anschließend mit der zehnfachen Menge an Verdünnungslösung, pH 7,2 , gewaschen und bei 1500 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Es wurde die Zentrifuge Rotanta/K, Hettich verwendet. Der Vorgang wurde viermal wiederholt. Vom Sediment wurde eine 10% ige Aufschwemmung in PBS-Puffer 0,01 M, pH 7,2 , hergestellt.

15 ml der 10% igen Erythrozyten-Suspension wurden mit 15 ml HSA-Lösung (Konzentration 40 mg/ml HSA in PBS 0,01 M, pH 7,2) bzw. 15 ml BSA-Lösung (Konzentration ebenfalls 40 mg/ml vermischt und danach tropfenweise 7,5 ml 2,5% ige Glutaraldehyd unter ständigem Umrühren hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurde statt der Albuminlösung 15 ml PBS-Puffer 0,01 M, pH 7,2 dazugegeben. Die Polymerisation des Albumins war nach zwei Stunden bei Zimmertemperatur abgeschlossen. Die beschichteten Erythrozyten wurden viermal in PBS-Puffer gewaschen und bei 1500 rpm fünf Minuten lang zentrifugiert. Ein fünftes Mal wurden die Erythrozyten in PBS-Puffer gewaschen, der zusätzlich 1% inaktiviertes Normalkaninchenserum (NKS) und 1% Sucrose enthielt. Abschließend wurde die Erythrozyten-Suspension auf 1,5% eingestellt mit PBS-Puffer, der wiederum 1% inaktiviertes NKS und Sucrose enthielt.

Von den Patientenseren bzw. Probandenseren wurden in Mikrotiterplatten mit Rundböden (PS-Mikrotiterplatte 96 K, U-Form, Greiner, Art.Nr. 650101) Serienverdünnungen hergestellt und die mit polymerisiertem HSA bzw. BSA beschichteten Erythrozyten hinzugefügt. Als Negativkontrolle diente das nicht beschich-

lete Blut, das mit den Seren keine Agglutination ergeben durfte. Eine Spontanagglutination der Erythrozyten wurde durch Zugabe von reinem Puffer ausgeschlossen. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde das Ergebnis abgelesen. Der Titer wurde durch die höchste Verdünnungsstufe angegeben, die noch eindeutig eine Hämagglutination herbeiführte.

Puffer für die passive Hämagglutination:

Algolver Lösung

Glucose	2,46 g
Tri-Natrium-Citrat-2-hydrat	0,96 g
Natriumchlorid	0,50 g
Aqua dest.	ad 120,0 ml

Einstellung des Puffers mit Zitronensäure auf pH 6,1

Verdünnungslösung

Dinatriumhydrogenphosphat	1,78 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,41 g
Natriumchlorid	8,0 g
Aqua dest	ad 1000,0 ml

Einstellung des Puffers auf pH 7,2

2.2.3.2. Immundiffusion nach Ouchterlony

Die durchgeführte Immundiffusion entsprach der Methode nach Lenkel, 1980 a, mit geringen Abweichungen.

In einem mit Barbitat-Puffer, pH 8,6, Ionenstärke 0,02 gepufferten 0,8% igem Agarosegel wurden in einem Rosetten-System sieben Löcher mit einem Durchmesser von 3 mm und einem Abstand von 3 mm zwischen dem zentralen Loch und den äußeren Löchern ausgestanzt.

In das zentrale Loch wurden 10 µl unverdünntes Patienten- bzw. Probandenserum gegeben, in die sechs äußeren Löcher je 10 µl von sechs Verdünnungsstufen des Antigens, ausgehend von der Konzentration 1 mg/ml. Die darauf folgenden Konzentrationen waren so gewählt, daß sie jeweils die halbe Konzentration der vorherigen Verdünnungsstufe hatten, bis 0,03 mg/ml als Endver-

dünnung erreicht war.

Antigen und Antikörper ließ man 48 Stunden bei Raumtemperatur gegeneinander im Gel diffundieren. Nach einstündiger Wässerung in Aqua dest. und erstmaligem Aufzeichnen der gebildeten Präzipitationsbanden wurden die Gele getrocknet und mit Azocarmin angefärbt (Scheidegger, 1955). Darauf folgte die zweite Auswertung.

Der Titer des Antikörpers wurde in der höchsten Verdünnungsstufe des Antigens angegeben, die noch die Ausbildung einer Präzipitationsbande ergeben hatte.

2.2.3.3. Inhibitionsversuche

Um die Spezifität der Albuminbindung zu prüfen und die Möglichkeit zu haben, zwischen Rezeptor des HBsAg einerseits und Autoantikörper andererseits zu unterscheiden, wurde die Häm-agglutination-Inhibition mit pHSA und pBSA als Antigen eingesetzt. Dazu wurden die Endpunktverdünnungen der Seren mit dem Antigen in einer Serienverdünnung, ausgehend von einer Eiweißkonzentration von 1 mg/ml, für 24 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Als Eiweiß wurden mHSA, pHSA und pBSA eingesetzt. Die geringste Albuminkonzentration, die noch eine deutliche Inhibition zeigte, wurde registriert.

3. Ergebnisse

3.1. Tierversuche

3.1.1. Optimierung der passiven Hämagglutination

Um das Optimum der eingesetzten Antigenkonzentration bei der passiven Hämagglutination herauszufinden, wurde eine Versuchsreihe durchgeführt. Ausgehend von 0,1 mg/ml wurde die Antigenkonzentration bis auf 10 mg/ml erhöht. Als Referenzserum wurde anti-pHSA verwendet. Der höchste Titer, das heißt die stärkste Serumverdünnung, die noch eine Hämagglutination mit pHSA beschichteten Erythrozyten zeigte, wurde bei einer Konzentration von 5 mg/ml erreicht. Eine Konzentrationssteigerung brachte keine weitere Titererhöhung mit sich (Abb. 2).



Abb. 2

Optimierung der passiven Hämagglutination bei Kaninchenserum
Die Abbildung zeigt den unterschiedlichen Hämagglutinations-Titer bei den mit steigender Antigenkonzentration beschichteten Hammelerythrozyten. Das Referenzserum war anti-pHSA. Die eingesetzte pHSA-Konzentration war (Spalten von links nach rechts): 0,1; 0,25; 0,5; 5,0 und 10,0 mg/ml. Die Erythrozyten in der 2. Spalte von rechts waren zur Kontrolle unbeschichtet. Die 1. Spalte von rechts enthielt kein Serum, sondern PBS-Puffer zum Ausschluß von Spontanagglutination der beschichteten Erythrozyten.

3.1.2. Nachweis von Antikörpern gegen monomere und polymere Albumine

3.1.2.1. Passive Hämagglutination

Die Präseren der Kaninchen, das heißt Seren, die den Tieren vor der Immunisierung entnommen wurden, zeigten keine Hämagglutination mit einem der vier Antigene mHSA, pHSA, mBSA und pBSA (Abb. 3). Jedes der immunisierten Tiere entwickelte nach 21 Tagen einen mit der passiven Hämagglutination nachweisbaren Antikörpertiter gegen das betreffende geimpfte Antigen. Bis zum 31. Tag, eine Woche nach der vierten Impfung, stieg der Antikörpertiter weiter an und erreichte eine bei den verschiedenen Kaninchen unterschiedliche Höhe zwischen $\log_2 T = 11$ bis 13. Anti-mHSA und anti-pHSA reagierten mit mHSA und pHSA beschichteten Erythrozyten, ebenso anti-mBSA und anti-pBSA mit mBSA und pBSA. Darüber hinaus ließ sich auch eine Agglutination von anti-mHSA und anti-pHSA mit mBSA und pBSA bzw. von anti-mBSA und anti-pBSA mit mHSA und pHSA finden (Abb. 4 - 7). Die Antiseren gegen pHSA, mBSA und pBSA zeigten, wenn auch nur in einem geringen Maß, eine Hämagglutination mit homologem polymerem Kaninchenserumalbumin (pRSA). Das pRSA war ebenfalls durch Glutaraldehydbehandlung gewonnen worden.

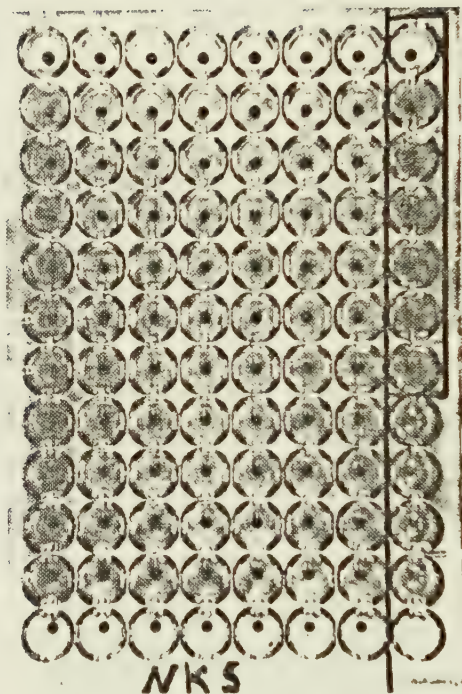


Abb. 3

Fehlende Hämagglutination des Präserums von Kaninchen Nr. 2 (anti-pHSA) mit den antigenbeschichteten Erythrozyten. Die Erythrozyten waren beschichtet mit (Spalten von links nach rechts): mHSA, pHSA, mBSA, pBSA, pH6A und pBSA. Die Erythrozyten in der 2. Spalte von rechts waren zur Kontrolle unbeschichtet. Die 1. Spalte von rechts enthielt kein Serum, sondern PBS-Puffer. Dadurch sollte überprüft werden, ob eine Spontanagglutination der antigenbeladenen Erythrozyten auftritt.

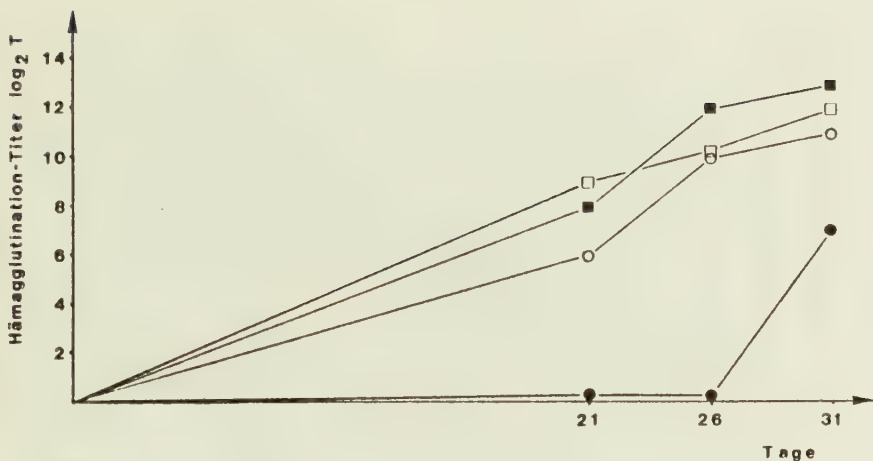


Abb. 4

Reaktion des Serums von einem Kaninchen, immunisiert mit mHSA (anti-mHSA) gegen mHSA (■), pHSA (□), mBSA (●) und pBSA (○) beschichteten Hammelerythrozyten. Die Abszisse gibt die Tage nach Entnahme des Präserums und der 1. Immunisierung mit mHSA als Antigen an.

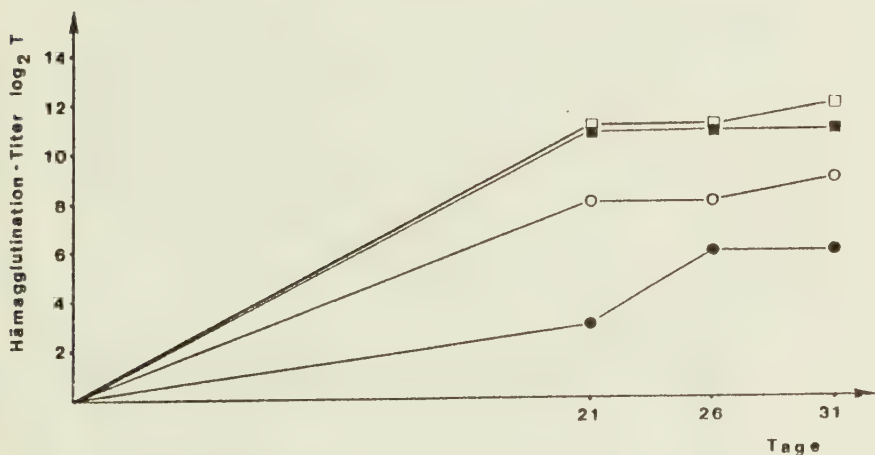


Abb. 5

Reaktion des Serums von einem Kaninchen, immunisiert mit pHSA (anti-pHSA) gegen mHSA (■), pHSA (□), mBSA (●) und pBSA (○) beschichteten Hammelerythrozyten. Die Abszisse gibt die Tage nach Entnahme des Präserums und der 1. Immunisierung mit pHSA als Antigen an.

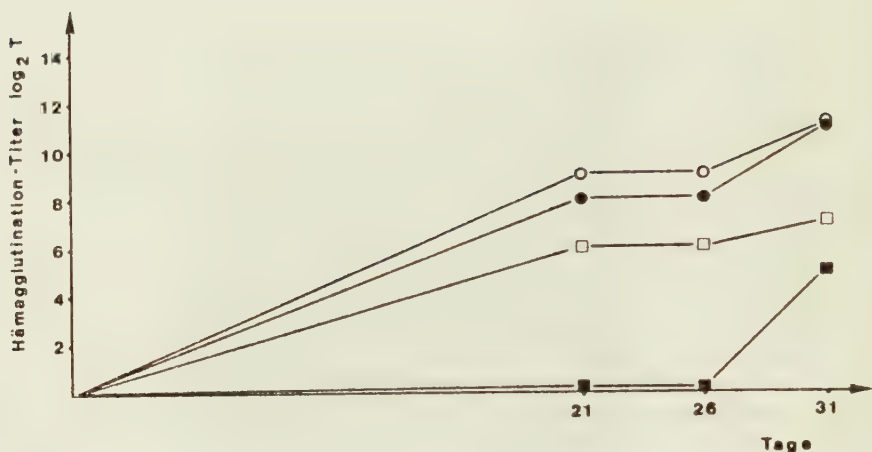


Abb. 6

Reaktion des Serums von einem Kaninchen, immunisiert mit mBSA (anti-mBSA) gegen mHSA (■), pHSA (□), mBSA (●) und pBSA (○) beschichteten Hammelerythrozyten. Die Abszisse gibt die Tage nach Entnahme des Präserums und der 1. Immunisierung mit mBSA als Antigen an.

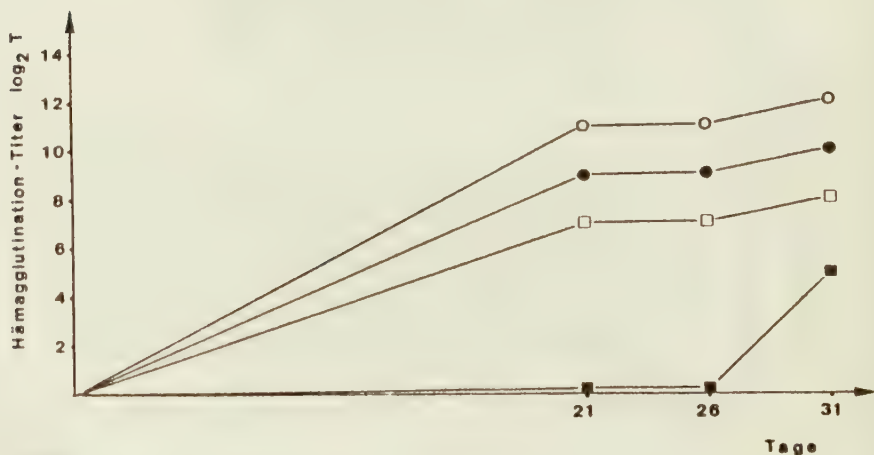


Abb. 7

Reaktion des Serums von einem Kaninchen, immunisiert mit pBSA (anti-pBSA) gegen mHSA (■), pHSA (□), mBSA (●) und pBSA (○) beschichteten Hammelerythrozyten. Die Abszisse gibt die Tage nach Entnahme des Präserums und der 1. Immunisierung mit pBSA als Antigen an.

3.1.2.2. Inhibitionsversuche

Zur Überprüfung der Spezifität der gemessenen Reaktion wurden Inhibitions- und Absorptionsversuche durchgeführt. Inkubierte man anti-pHSA, das von Kaninchen Nr. 2 gewonnen wurde, mit pHSA, so erfolgte eine Inhibition der Hämagglutination mit pHSA beladenen Erythrozyten bis zu einer Konzentration von 2 µg/ml, während die Inhibition mit pBSA ausblieb. Eine ähnlich hohe Inhibition mit pBSA nämlich bis 8 µg/ml erreichte man bei der Inkubation des anti-pBSA-Serums von Kaninchen Nr. 4, wenn man die Hämagglutination mit pBSA beschichteten roten Blutkörperchen anwendete.

Bei der Absorption mit monomerem Albumin wurde die Agglutination der Antikörper gegen das monomere Antigen derselben Spezies aufgehoben, der Titer gegen das polymere stark reduziert. Auch gegen die monomeren und polymeren Antigene der anderen Spezies fand eine geringe bis mäßig ausgeprägte Titererniedrigung statt (Tab. 1).

Serum	absorbiert mit	mHSA	pHSA	mBSA	pBSA	Kontrolle
anti-mHSA	—	11	11	5	7	0
	HSA	0	6	0	0	0
	BSA	6	10	0	0	0
anti-pHSA	—	10	12	5	8	0
	HSA	0	9	0	5	0
	BSA	9	12	0	7	0
anti-mBSA	—	7	11	13	12	0
	HSA	0	10	11	11	0
	BSA	0	4	0	9	0
anti-pBSA	—	6	9	11	12	0
	HSA	0	6	10	11	0
	BSA	0	3	0	6	0

Tab. 1

Reaktion der vier Antiseren in der passiven Hämagglutination vor und nach Absorption mit HSA bzw. BSA. Der Hämagglutinations-Titer wird als $\log_2 T$ angegeben.

3.1.2.3. Immundiffusion nach Ouchterlony

Die Immundiffusion sollte wie die passive Hämagglutination den Nachweis von Antikörpern gegen die geimpften Antigene mHSA, pHSA, mBSA und pBSA liefern. Die Präseren der Kaninchen zeigten keine Reaktion, das heißt es wurden keine Präzipitationslinien ausgebildet. Vergleichbar mit den höchsten Titern in der passiven Hämagglutination am 31. Tag, wurden die Präzipitationsbanden bei den Seren am deutlichsten sichtbar, die den Kaninchen nach der 4. Immunisierung entnommen worden waren. Es zeigte sich, daß jeweils eine Reaktion mit anti-mHSA bzw. anti-pHSA und den Antigenen mHSA und pHSA stattfand. Bei den Antiseren gegen mBSA und pBSA trat ebenfalls mit den monomeren und polymeren Rinderalbuminen eine Präzipitation ein. Kreuzreaktionen ließen sich zwischen anti-pHSA und pBSA, anti-mBSA und pHSA, sowie zwischen anti-pBSA und pHSA nachweisen. Im Fall von anti-pHSA gegen pBSA als Antigen war die Präzipitation jedoch nur sehr schwach ausgebildet. Keine Reaktion wurde im Gegensatz zur passiven Hämagglutination zwischen dem Serum mit anti-mHSA und dem Antigen pBSA beobachtet (Abb. 8).

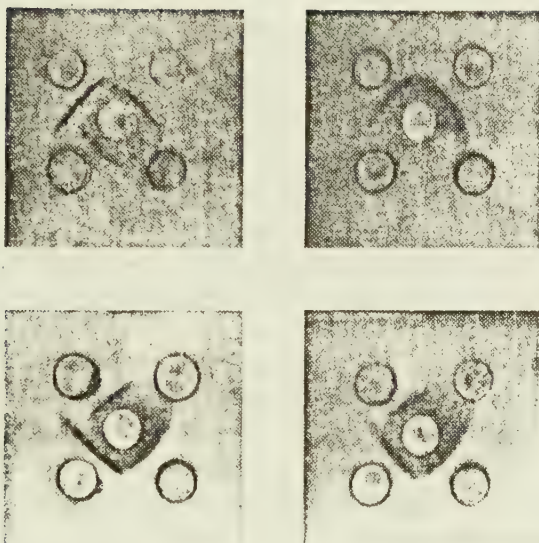


Abb. 8

Präzipitationsbanden der vier Kaninchenserum nach der letzten Immunisierung. In den zentralen Löchern befindet sich links oben: anti-phSA; rechts oben: anti-mHSA; links unten: anti-pBSA; rechts unten: anti-mBSA. In den vier äußeren Löchern befindet sich jeweils links oben: phSA; rechts oben: mHSA; links unten: pBSA und rechts unten: mBSA.

3.2. Humanseren

3.2.1. Optimierung der passiven Hämagglutination

Das Optimum der eingesetzten Antigenkonzentration bei der passiven Hämagglutination wurde durch eine Versuchsreihe ermittelt. Je 15 ml einer 10% igen Formolerythrozyten-Suspension wurden mit 15 ml einer HSA-Lösung verschiedener Konzentrationen vermischt. Die Konzentration der HSA-Lösung wurde von 5 mg/ml aus beginnend, zunächst beim zweiten Ansatz auf 10 mg/ml, danach in Schritten um 10 mg/ml gesteigert, bis maximal eine Konzentration von 60 mg/ml erreicht war. Danach wurden tropfenweise 7,5 ml 2,5% iges Glutaraldehyd unter ständigen Umrühren hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurde statt der Albuminlösung 15 ml PBS-Puffer 0,01 M, pH 7,2 , dazugegeben. Der weitere Versuchsablauf entsprach der unter 2.2.3.1. geschilderten Technik. Als Referenzseren wurden ein Serum aus dem Patientenkollektiv I mit HBsAg-positiver chronisch aktiver Hepatitis und ein Kontrollserum aus der Kontrollgruppe I zur Ermittlung der optimalen Antigenkonzentration verwendet. Ab einer Konzentration von 40 mg/ml erzielte man bei dem Patientenserum keine weitere Titererhöhung. Das Optimum war bei dem Kontrollserum schon bei 30 mg/ml erreicht. Der größte Titerunterschied zwischen den beiden Seren war bei 40 mg/ml zu beobachten (Abb. 9).

Insgesamt sechs exemplarisch ausgewählte Patienten- und Kontrollseren sollten klären, ob der Rhesusfaktor der beschichteten Humanerythrozyten einen Einfluß auf die Titerhöhe hat. Zu diesem Zweck wurde die pHSA-Bindungsfähigkeit der sechs Seren in der passiven Hämagglutination sowohl mit pHSA beschichteten Erythrozyten der Blutgruppe O Rhesus positiv, als auch mit O Rhesus negativem Blut bestimmt. Es konnte jedoch kein wesentlicher Unterschied in Bezug auf den Titer zwischen Rhesus positivem und Rhesus negativem Blut der Blutgruppe O verzeichnet werden.

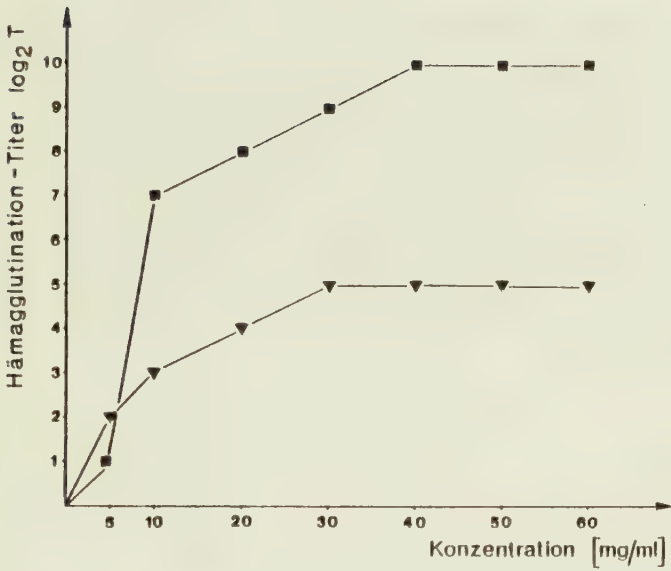


Abb. 9

Die pHSA-Bindungsaktivität in der passiven Hämagglutination eines Patientenserums mit HBsAg-positiver CAH (■) und eines Kontrollserums (▼) in Abhängigkeit von der eingesetzten HSA-Konzentration.

3.2.2. Reaktion von Humanseren mit polymeren Albuminen

3.2.2.1. Das Kontrollkollektiv

Die Normalseren reagierten ohne Einschränkung mit pHSa und pBSa beschichteten roten Blutkörperchen mit einem Titer, der sich deutlich von der Kontrolle mit unbeschichteten Erythrozyten unterschied. Letzterer lag bei einem Wert zwischen $\log_2 T = 0$ und 1, in ganz wenigen Ausnahmen bei 2. Es gab keinen signifikanten Unterschied im Mittelwert des Titers zwischen männlichen und weiblichen Probanden (der Mittelwert des $\log_2 T$ ergab bei Männern: $\bar{m} = 3,06 \pm 0,69$ und bei Frauen: $\bar{m} = 3,15 \pm 0,62$ $p > 0,05$) (Abb. 10).

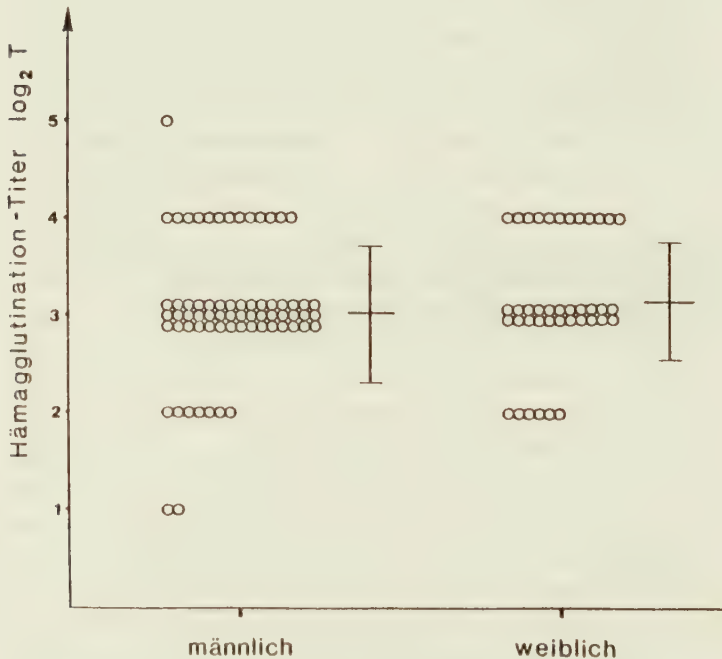


Abb. 10

Vergleich der pHSa-Bindungsaktivität der Kontrollgruppe I in der passiven Hämagglutination zwischen männlichen und weiblichen Probanden.

Ebenso war keine signifikante Differenz in der pHSA-Bindung zwischen der gesamten Kontrollgruppe I (KG I) und derjenigen Gruppe zu finden, die Antikörper gegen Hepatitis A, Hepatitis B, oder beides, bzw. Autoantikörper aufwiesen (Kontrollgruppe II = KG II) (Abb. 11). Die Signifikanz war größer als 0,05.

Bei beiden Kontrollgruppen reagierten die Seren mit pHSA beschichteten Erythrozyten mit einem ähnlich hohen Titer wie mit pBSA behandelten Erythrozyten (der Mittelwert des $\log_2 T$ lag bei KG I: pHSA $\bar{m} = 3,09 \pm 0,69$; pBSA $\bar{m} = 3,12 \pm 0,72$ und bei KG II: pHSA $\bar{m} = 3,29 \pm 0,64$; pBSA $\bar{m} = 3,14 \pm 0,79$) (Abb. 11).

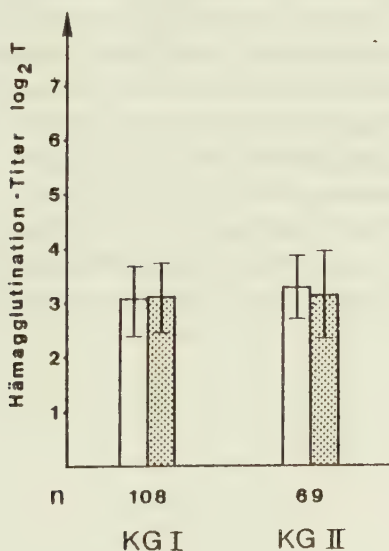


Abb. 11

Vergleich zwischen der pHSA- (□) und pBSA- (▨) Bindungsaktivität der Kontrollgruppe I und II in der passiven Hämagglutination

Die obere Grenze der Reaktion von Normalseren wurde durch den mittleren Titer aller Kontrollpersonen I zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung bei $\log_2 T = 5,13$ festgelegt. Sämtliche Titer dieses Kollektivs lagen unterhalb dieser Grenze (Abb. 10).

Keine Differenz im Hämagglutinations-Titer gab es zwischen den frisch gewonnenen und den nach einmaligem Einfrieren wieder aufgetauten Seren derselben Probanden des Kontrollkollektivs I. Acht exemplarisch ausgewählte Normalseren mit den Titerstufen von $\log_2 T = 2$ bis 5 reichend, zeigten weder eine Inhibition mit mISA, noch mit den Polymeren von HSA und BSA.

Die Immundiffusion nach Ouchterlony brachte bei dem Kontrollkollektiv I folgende Befunde: Lediglich 2 Seren der insgesamt 108, das entspricht ungefähr 2%, reagierten mit pHSA unter Ausbildung von Präzipitationsbanden. Es muß dabei erwähnt werden, daß die eingesetzte Antigenkonzentration mit 1,0 bzw. 0,5 mg/ml hoch war. Auch bei schwächerer Konzentration wurde keine Reaktion beobachtet. Bei dem Kontrollkollektiv II lag der Prozentsatz mit knapp 3% unbedeutend höher (2 von 69 Seren).

Die 14 frischen Seren zeigten auch nach dem einmaligen Einfrieren die gleiche Titerstufe wie zuvor. Die Immundiffusion erbrachte in allen 14 Fällen keine Präzipitationsbanden.

3.2.2.2. Das Patientenkollektiv I

Die Unterscheidung, ob ein Serum als positiv oder negativ in der passiven Hämagglutination zu werten war, wurde durch den mittleren Titer aller Kontrollpersonen I zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung bestimmt. Dieser Grenzwert wurde mit $\log_2 T = 5,13$ festgesetzt. Alle Seren, deren Hämagglutinations-Titer über dieser Grenze lagen, wurden als positiv reagierend angesehen. Die übrigen Seren wurden negativ bewertet, da ihr Titer innerhalb des festgesetzten Normbereiches war. Höchste Titer in der passiven Hämagglutination wurden bei der akuten Virushepatitis B ($\log_2 T \bar{m} = 5,7 \pm 2,27$), bei der chronisch aktiven Hepatitis B ($\log_2 T \bar{m} = 5,77 \pm 2,31$) und bei der durch Virushepatitis B bedingten Lebercirrhose ($\log_2 T \bar{m} = 5,23 \pm 2,42$) gefunden. Auffällig waren 6 weitere Seren mit erhöhtem Hämagglutinations-Titer, die nachweislich keine HBsAg-Partikel enthielten. Darunter waren 2 Seren von Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis unklarer Genese (CAH u.G.) und je ein Patientenserum mit Virushepatitis A, chronisch aktiver Hepatitis NANB, sowie ein Serum eines PBC-Patienten (siehe Abb. 12). Schließlich gab es ein Serum aus der Gruppe der FNHI, es war ein Patient mit Sjögren-Syndrom, das einen erhöhten Hämagglutinations-Titer zeigte (Abb. 13).

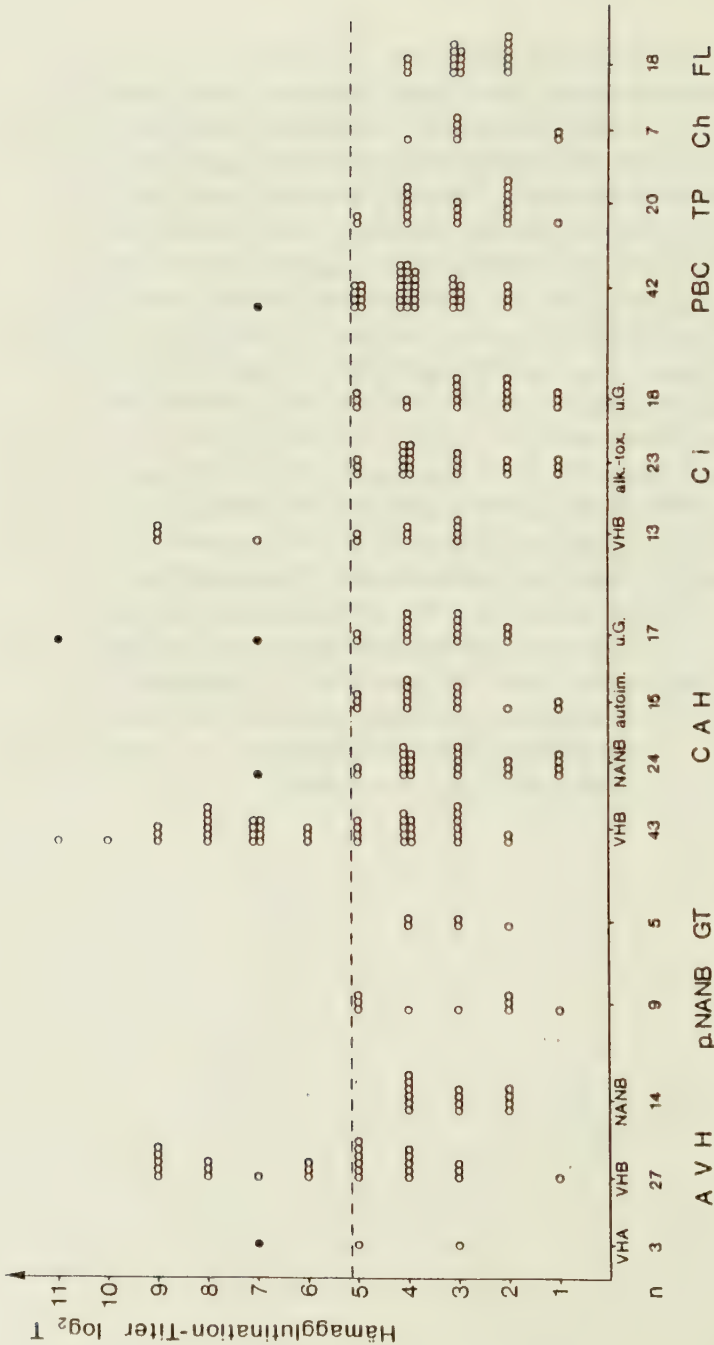


Abb. 12

Die pHSA-Bindungsaktivität des Patientenkollektivs I gemessen durch die passive Hämagglutination. HbAg-negative Seren mit erhöhter pHSA-Bindungsaktivität sind als ● gekennzeichnet, alle übrigen Seren als O dargestellt.

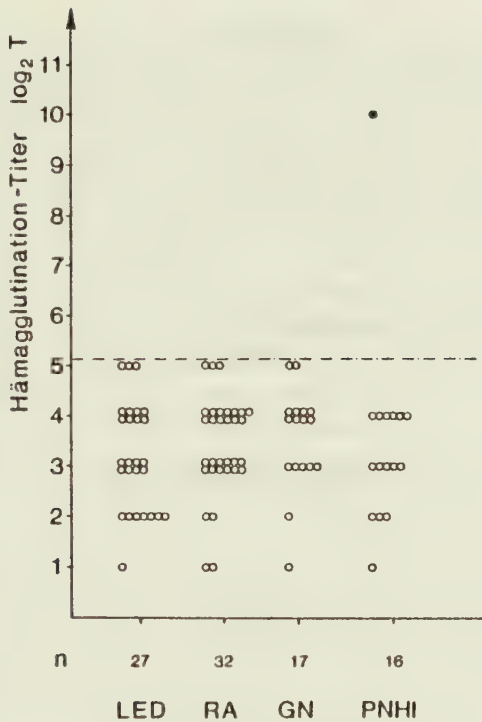


Abb. 13

Die pHSA-Bindungsaktivität des Patientenkollektivs I gemessen durch die passive Hämagglutination. HBsAg-negative Seren mit erhöhter pHSA-Bindungsfähigkeit sind als ● gekennzeichnet, alle übrigen Seren als O dargestellt.

Die Agglutination ließ sich bei allen positiv reagierenden Seren nicht mit mHSA inhibieren. Dagegen war pHSA in der Lage, die Reaktion bei den Seren mit akuter Virus-Hepatitis-B, chronisch aktiver Hepatitis B und Lebercirrhose nach Virus-B-Hepatitis zu inhibieren. Zur Inhibition reichten pHSA-Konzentrationen von 4 µg/ml bis maximal 125 µg/ml aus. Die Inhibition fehlte jedoch, wenn man statt pHSA das polymere Rinderserumalbumin (pBSA) verwendete. Diese Reaktionen erwiesen sich somit als spezie (human)-spezifisch. Eine fragliche Inhibition mit pHSA und pBSA konnte bei den HBsAg-negativen Seren erzielt werden, die in der passiven Hämagglutination positiv reagiert hatten. Lediglich Konzentrationen von 1,0 und 0,5 mg/ml vermochten die Reaktion zu inhibieren. Der Vergleich zwischen pHSA und pBSA beschichteten Erythrozyten brachte jeweils nur einen deutlichen Unterschied bei den HBsAg-positiven Seren (akute Virus Hepatitis B - pHSA: $\log_2 T \bar{m} = 5,7 \pm 2,27$; pBSA: $\log_2 T \bar{m} = 4,19 \pm 1,47$ $p < 0,005$; chronisch aktive Hepatitis B - pHSA: $\log_2 T \bar{m} = 5,77 \pm 2,31$; pBSA: $\log_2 T \bar{m} = 3,23 \pm 1,07$ $p < 0,0005$; HBsAg-positive Cirrhose - pHSA: $\log_2 T \bar{m} = 5,23 \pm 2,42$; pBSA: $\log_2 T \bar{m} = 3,46 \pm 0,97$ $p < 0,025$). Bei den restlichen HBsAg-negativen Seren lag der mittlere Hämagglutinations-Titer zwischen pHSA und pBSA beschichteten roten Blutkörperchen etwa in gleicher Höhe (p jeweils $> 0,05$) (Abb. 14).

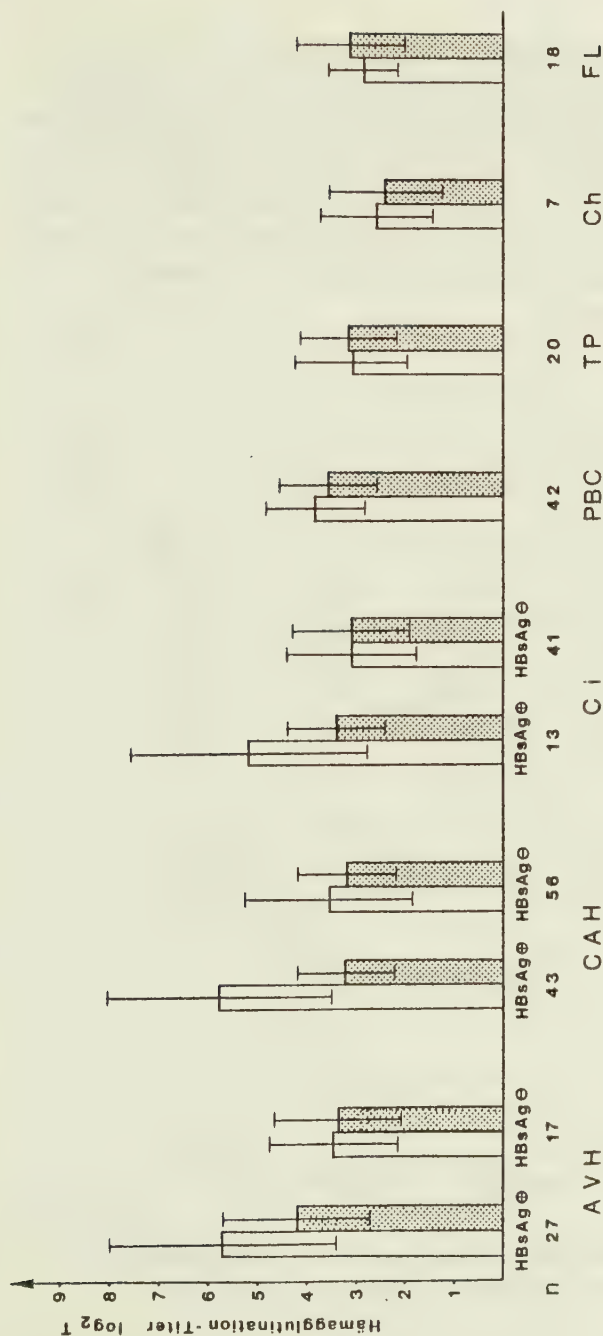


Abb. 14

Vergleich zwischen den mittleren Hämagglutinations-Titern von PHEA (□) und pBSA (▨) beschichteten Erythrozyten der Patientenserum mit Lebererkrankungen (PK I).

Teilte man die HBeAg-positiven Patientenserum in eine Gruppe mit HBeAg-positiv bzw. anti-HBe-positiv ein, so zeigte sich ein deutlicher Unterschied im mittleren Hämagglutinations-Titer. Während der Mittelwert des $\log_2 T$ bei den HBeAg-positiven Seren mit $6,06 \pm 2,17$ deutlich über dem Grenzwert lag, befand sich der Mittelwert des $\log_2 T$ bei anti-HBe-positiven Seren mit $4,24 \pm 1,54$ innerhalb des Grenzbereiches, der bis $\log_2 T = 5,13$ reicht ($p < 0,0005$) (Abb. 15).

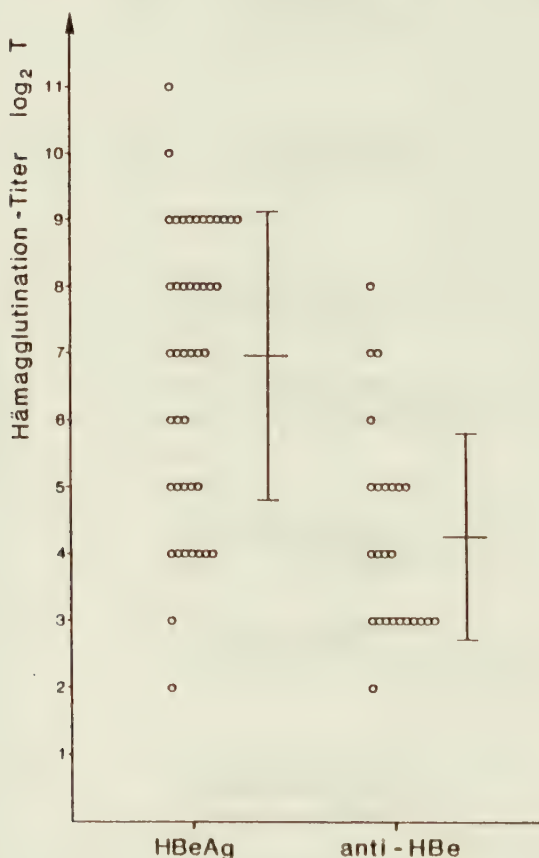


Abb. 15

Vergleich der pISA-Bindungsaktivität in der passiven Hämagglutination zwischen HBeAg- und anti-HBe-positiven Seren.

Bei den Seren von Patienten, die keine Lebererkrankung aufwiesen, war der mittlere Hämagglutinations-Titer nicht erhöht. Der Vergleich im Titer zwischen pHSA und pBSA beschichteten roten Blutkörperchen ergab keinen wesentlichen Unterschied ($p > 0,05$) (Abb. 16).

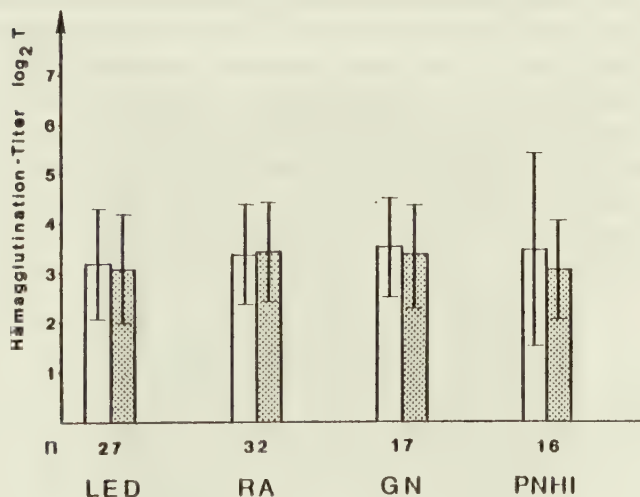


Abb. 16

Vergleich zwischen den mittleren Hämagglutinations-Titern von pHSA $\square$ und pBSA $\boxtimes$ beschichteten Erythrozyten der Patientenserum mit nicht hepatischen Erkrankungen (PK II).

Die Immundiffusion zeigte bei den bei -20°C gelagerten und wieder aufgetauten Seren folgende Befunde (Tab.2):

Vor allem Patientenseren mit Lebercirrhose reagierten besonders häufig in der Immundiffusion (34,7% - 76,9%), gefolgt von der akuten Virus Hepatitis B (37,0%), chronisch aktiven Hepatitiden (23,5% - 34,9%) und PBC (33,3%). Weniger häufig reagierten die Seren von Patienten mit protrahierter NANB (22,2%) oder akuten NANB (14,2%), toxischem Parenchymschaden (5,0%) und sogenannte gesunde HBsAg-Träger (20,0%). Keine Präzipitationsbanden zeigten sich bei Seren mit akuter Virus-A-Hepatitis, extrahepatischer Cholestase und Fettleber. Faßte man alle Patientenseren mit Lebererkrankungen in einer Gruppe zusammen, so reagierten 29,2% in der Immundiffusion positiv. Abb. 17 zeigt die Präzipitationsbanden eines Serums von einem Patienten mit HBsAg-positiver Lebercirrhose.

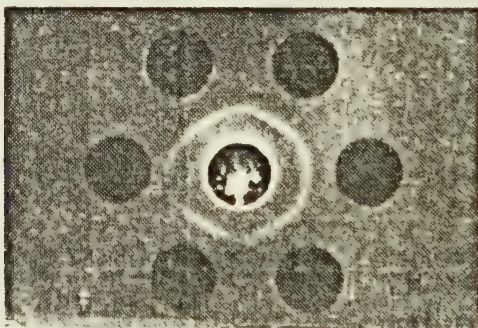


Abb. 17

Reaktion eines Patientenserums mit HBsAg-positiver Lebercirrhose in der Immundiffusion nach Ouchterlony mit pHSA. Im zentralen Loch war unverdünntes Patientens Serum, in den sechs äußeren Löchern pHSA enthalten. Beginnend mit einer Konzentration von 1 mg/ml (links oben) wurden im Uhrzeigersinn absteigende Konzentrationen verwendet.

Auch bei Lupus erythematosus disseminatus (37,0%), rheumatoider Arthritis (71,9%), Glomerulonephritis (5,9%) und einer weiteren Gruppe von verschiedenen Immunopathien (43,7%) konnten Präzipitationsbanden beobachtet werden.

Je fünf Seren aus der Gruppe der Lebererkrankungen, rheumatischen Arthritis und Lupus erythematodes disseminatus wurden in der Immundiffusion gegen Monomere von HSA und BSA, sowie gegen die polymeren Albumine pHSA und pBSA getestet. Bei allen 15 Seren fehlte eine Reaktion mit den monomeren Antigenen, während sich sowohl gegen pHSA als auch gegen pBSA Präzipitationsbänder in vergleichbarem Titer bildeten. Die in der Immundiffusion gemessene Reaktion war somit nicht speziesspezifisch, wie Abb. 18 und 19 exemplarisch zeigen.

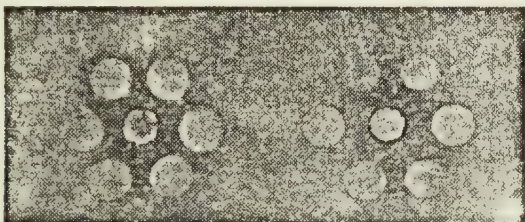


Abb. 18

Fehlende Reaktion von mHSA und mBSA mit dem Serum eines Patienten mit PBC. In den zentralen Löchern befand sich unverdünntes Serum. In den sechs äußeren Löchern war mHSA (links) bzw. mBSA (rechts) enthalten. Beginnend mit einer Konzentration von 1 mg/ml (links oben) wurden im Uhrzeigersinn absteigende Konzentrationen verwendet.

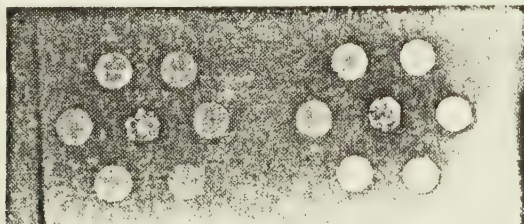


Abb. 19

Ausbildung von Präzipitationsbändern bei Verwendung von pHSA und pBSA und dem Serum desselben Patienten mit PBC wie bei Abb. 18. In den zentralen Löchern war unverdünntes Patientenserum vorhanden, in den sechs äußeren pHSA (links) und pBSA (rechts).

Erkrankung		Zahl der Serum n°	Immuddiffusion positiv n°	Prozent	
AVH	VHA	3	0	0,0	27,3
	VHB	27	10	37,0	
	NANB	14	2	14,2	
p. NANB		9	2	22,2	
GT		5	1	20,0	
CAH	VHB	43	15	34,9	32,3
	NANB	24	8	33,3	
	autoim.	15	5	33,3	
	u.G.	17	4	23,5	
CI	VHB	13	10	76,9	46,3
	alk.-tox.	23	8	34,7	
	u.G.	18	7	38,9	
PBC		42	14	33,3	
TP		20	1	5,0	
Ch		7	0	0,0	
FL		18	0	0,0	
LED		27	10	37,0	
RA		32	23	71,9	
GN		17	1	5,9	
PNHI		18	7	43,7	
KG I		108	2	1,9	

Tab. 2

Absolute und relative Häufigkeit des Auftretens von pHSA-Bindung im Patientenkollektiv I und Kontrollkollektiv I (KG I), getestet durch die Immuddiffusion nach Ouchterlony.

3.2.2.3. Das Patientenkollektiv II

92 Patientenserum mit Lebererkrankungen wurden frisch unmittelbar nach der Blutentnahme in der Immundiffusion nach Duchterlony getestet. Sah man von der Höhe des Präzipitations-Titers ab, so reagierten 73,3% der Seren mit akuter Virus-B-Hepatitis ($n = 15$) positiv, 66,6% der akuten NANB ($n = 12$), 86,6% der HBsAg-positiven CAH ($n = 15$), 72,7% der CAH nach NANB-Infektion ($n = 11$), 100,0% der autoimmunen CAH ($n = 4$) und 57,1% der CAH unklarer Genese ($n = 7$). Auffällig war, daß 100,0% der Seren von Patienten mit Cirrhosen ($n = 16$) unabhängig von ihrer Entstehungsart, also einschließlich der autoimmunen Form und der PBC, unter Ausbildung von Präzipitationsbanden mit pHSA reagierten. Auch die beiden Seren von sogenannten gesunden HBsAg-Trägern zeigten Präzipitationslinien. Mit 20,0% zeigte die Gruppe der toxischen Leberparenchymschäden ($n = 10$) die geringste Häufigkeit einer pHSA-Bindungsaktivität (siehe Tab. 3).

Neben der Häufigkeit des Auftretens von Präzipitationsbanden interessierte, ob es eine Korrelation zwischen der Höhe von Leberenzymwerten als Zeichen einer Leberzellnekrose bzw. der Höhe von Gamma-Globulinen und dem Präzipitations-Titer gab. Als Leberenzym wurde die Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (SGPT) gewählt. Keine Korrelation konnte zwischen der Höhe der SGPT aller 92 Patientenserum und dem Präzipitations-Titer gefunden werden ($p = 0,446$), dagegen war eine positive Korrelation zwischen der Höhe der Gamma-Globuline und dem Präzipitations-Titer zu erkennen ($p = 0,002$).

Erkrankung		Zahl der Serum n:	Immundiffusion — positiv n:	Prozent	
A V H	VHB	15	11	73,3	70,4
	NANB	12	8	66,6	
C A H	VHB	15	13	86,6	78,4
	NANB	11	8	72,7	
	autoim.	4	4	100,0	
	u.G.	7	4	57,1	
C i	VHB	4	4	100,0	100,0
	alk.-tox.	4	4	100,0	
	u.G.	6	6	100,0	
	autoim.	1	1	100,0	
P B C		1	1	100,0	
G T		2	2	100,0	
T P		10	2	20,0	

Tab. 3

Absolute und relative Häufigkeit des Auftretens von pHSA-Bindung im Patientenkollektiv II, getestet durch die Immendiffusion nach Ouchterlony.

4. Diskussion

Sinn der Tierexperimente sollte der Nachweis von polymer-spezifischen Determinanten auf den Albuminmolekülen sein. Die Kurzzeittimmunisierung der vier Kaninchen mit jeweils einem der Antigene mHSA, pHSA, mBSA und pBSA induzierte, wie schon oben erwähnt, eine Antikörperproduktion. Durch die passive Hämagglutination und Immundiffusion nach Ouchterlony konnte nachgewiesen werden, daß diese Antikörper kreuz-reagieren, das heißt, die Kaninchenserum reagierten nicht nur mit dem monomeren und polymeren Albumin der Spezies, gegen das sie immunisiert worden waren, sondern auch mit dem monomeren und polymeren Albumin einer anderen Spezies. Die ausgebliebene Reaktion in der Immundiffusion der Antiseren gegen das jeweilige monomere Antigen der anderen Spezies und das Fehlen der Präzipitationsbanden bei anti-mHSA, sowohl gegen das monomere wie polymere Rinderalbumin, liegt wohl in der unterschiedlichen Sensitivität der beiden verwendeten Testverfahren begründet. Die passive Hämagglutination scheint in ihrer Empfindlichkeit höher zu liegen, als es bei der Immundiffusion der Fall ist. So zeigte sich erst bei einem Titer zwischen $\log_2 T = 7$ und 8 in der passiven Hämagglutination eine Ausbildung von Präzipitationsbanden in der Immundiffusion. Man konnte aufgrund der Kreuzreaktion der Kaninchenserum im Hämagglutinations-Test vermuten, daß es eine Determinante auf den Antigenen gibt, die monomeren wie polymeren Albuminen gemeinsam ist. Da nach der Absorption mit monomerem Albumin die Agglutination der Antikörper gegen das monomere Antigen der gleichen Spezies aufgehoben, der Titer gegen das polymere Antigen jedoch nur stark reduziert wurde, ließ dieser Versuch an das Vorhandensein einer weiteren Determinante auf den polymeren Albuminen denken. In Übereinstimmung mit Onica et al., 1978 a, könnte die zuerst genannte Determinante der "Haptenic"-Determinante entsprechen, welche durch die Glutaraldehyd-Behandlung entsteht. Unabhängig von der Verwendung einer hohen oder ge-

ringen Glutaraldehyd-Konzentration, ist die Determinante auf dem Monomer und allen Spezies von Polymeren lokalisiert. Sie ist deshalb nicht spezies-spezifisch. Die zweite Determinante auf den polymeren Albuminen wäre als "Struktur"-Determinante zu deuten, die durch den Polymerisationsprozeß gebildet wird. Dieser zweite Determinantentyp ist nur auf der polymeren Form von glutaraldehydbehandeltem Albumin vorhanden und sowohl von der Struktur des Albumins, als auch vom Polymerisationsprozeß abhängig. Trevisan et al., 1982, beurteilten diese "Struktur"-Determinante als spezies-spezifisch. Verschiedene Autoren (Onica et al., 1978 a; Lenkei, 1980 a) vermuteten, daß Molekülalterung beides, "Haptenic"- und "Struktur"-Determinanten induziert, ähnlich wie es eine Glutaraldehydbehandlung bewirkt. Es blieb nun die Frage bestehen, mit welcher Struktur der Albumine AAA reagieren. Onica et al., 1981, glaubten anhand ihrer Befunde, daß AAA mit einer Pyridinium-Struktur reagieren, die sich auf glutaraldehydbehandelten Proteinen befindet und Teil einer neuen antigenen Determinante ist. Die Existenz einer zusätzlich vorhandenen spezies-kreuzreagierenden polymerspezifischen Determinante konnte durch die Kurzzeitimmunisierung nicht sicher nachgewiesen werden. Es kann letztlich angenommen werden, daß durch die Immunisierungsexperimente polyklonale Antisera erzeugt werden, die mit verschiedenen Determinanten der Albuminmoleküle reagieren. Daß AAA auf dem gealterten Molekül nur die "Struktur"-Determinante erkennen, müßte angezweifelt werden, wenn sie als spezies-spezifisch zu betrachten ist. Weiterhin können AAA die "Haptenic"-Determinante auf mHSA und mBSA nicht erkennen. Als andere Möglichkeit bliebe deshalb die von Margineanu, 1983, angenommene Antigenkonformation bestehen, welche sich aus der Anwesenheit beider Determinanten ergibt, weil die "Haptenic"-Determinante allein nicht erkannt wird.

Es war auch eine Reaktion mit dem homologen polymerisierten Kaninchenserumalbumin (pRSA) nachzuweisen. Diese ließ an die Möglichkeit denken, daß es sich hierbei um Autoantikörper handelt, die durch Immunisierung mit heterologen Albuminpolymeren

entstanden waren. Der Titer dieser Antikörper war jedoch relativ gering.

Im Gegensatz zu Margineanu, 1983, konnte mit der Immundiffusion und Hämagglutination kein Nachweis von Autoantikörpern in Normalkaninchenseren erbracht werden. Alle vier Präseren der Kaninchen reagierten weder mit den Monomeren noch mit den Polymeren von mit HSA und BSA beschichteten Hammelerythrozyten (siehe Abb. 3). Die fehlende Reaktion in der passiven Hämagglutination mag jedoch ihre Ursache in der zum RIA vergleichbar geringeren Empfindlichkeit haben. Umsomehr kann angenommen werden, daß mit der Immundiffusion und passiven Hämagglutination durch die Immunisierung entstandene Antikörper nachgewiesen werden.

Die passive Hämagglutination zeigte bei allen Probandenseren der KG I und II einen geringen Titer, der bei $\log_2 T \bar{m} = 3,09 \pm 0,69$ bzw. $3,29 \pm 0,64$ lag. Es könnte sich hierbei entweder um eine unspezifische Reaktion handeln, da keine Inhibition weder mit pHSA noch mit pBSA stattfand, oder um das von Mihăescu et al., 1981, beschriebene pHSA-Bindungsvermögen von AAA bei Normalpersonen. Lenkei, 1980 a, schrieb, daß ein geringer Titer von Hämagglutination bei allen Seren vorkommt und erst ein Titer von $\log_2 T = 7$ als geringste Positivität anzusehen sei. Mihăescu glaubte jedoch, daß diese physiologischen Autoantikörper in Normalhumanseren in Titern auftreten, die nur durch RIA meßbar sind. Ob es ein physiologisches Vorkommen von AAA gibt, stand nicht im Vordergrund unserer Fragestellung. Es ging vielmehr um die Festlegung eines Grenztiters, mit dessen Hilfe überhöhte pHSA-Bindungsaktivitäten erkannt werden sollten.

Es konnte kein eindeutiger Nachweis für die Existenz von AAA durch die passive Hämagglutination geführt werden. Abb. 12 und 13 zeigen, daß lediglich sechs Patientenseren, die eindeutig HBsAg-negativ waren und somit der HBsAg assoziierte Rezeptor ausgeschlossen war, mit pHSA beschichteten Humanerythrozyten reagierten. Der Titer lag zweifelsfrei über der festgelegten Grenze von $\log_2 T = 5,13$. Die Inhibition der pHSA-Bindung mit pHSA und pBSA

war jedoch nicht signifikant, daß unter Umständen deshalb auch an eine unspezifische Reaktion gedacht werden müßte, die nicht durch Autoantikörper verursacht war. Der Nachweis eines so geringen Vorkommens von AAA bei Patienten mit Lebererkrankungen in unserer Untersuchung unterstützt die Studien von Pontisso, 1982. Mit Hilfe der passiven Hämagglutination entdeckte er AAA bei HBsAg-positiven Patienten in nur 5 von 89 Fällen. Es handelte sich dabei immer um eine anti-HBe-positive CAH. Vergleichbare Resultate fanden Hansson und Purcell, 1979, jedoch durch Anwendung empfindlicherer Testverfahren, wie ELISA und Radioimmunopräzipitation. Es wurden durch keine dieser beiden Methoden AAA festgestellt.

Im Gegensatz dazu glaubten andere Untersucher durch ihre Experimente, die Existenz von AAA nachweisen zu können. Lenkeit et al., 1977 a und 1980 b, überprüften die Anwesenheit von AAA-Agglutination bei zahlreichen Seren von Patienten mit Lebererkrankungen durch eine reverse passive Hämagglutination. AAA wurden hier als eine neue Kategorie von Autoantikörpern beschrieben, die sowohl bei HBsAg-positiven, als auch bei HBsAg-negativen Patientenserum in hohen Hämagglutinations-Titern auftraten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Thung und Gerber, 1981a. Darüberhinaus zeigten Thung und Gerber, 1981d, mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Technik, daß sie anhand unterschiedlicher Fluoreszenzmuster eine HBsAg-Rezeptor assoziierte pHSA-Bindung von der mit AAA an pHSA beladenen Erythrozyten unterscheiden können. Sie wollten damit auch das gleichzeitige Auftreten von Rezeptor- und AAA-Bindung für pHSA aufzeigen.

Die Untersuchung von Millich et al., 1981 a und b, legte dar, daß humanes C1q als möglicher Reaktionspartner für pHSA in Patientenserum ebenfalls in Frage kommt. Daß jedoch C1q im Hämagglutinations-Test für AAA interferiert, wurde von Onica et al., 1983 a, widerlegt. Als Beweis legten sie Versuche vor, die mit Seren vor und nach Inaktivierung bei 56°C, bzw. vor und nach C1q-Entfernung durch Adsorption an IgG-Sepharose 4 B durchgeführt wurden. In beiden Fällen wurde der Hämagglutinations-

Titer nicht oder nur geringfügig reduziert. Eine C1q-Interaktion mit pHSA wurde zwar von Onica et al., 1983 a, nicht ausgeschlossen, die passive Hämagglutination und die indirekte Immunfluoreszenz aber als zu unempfindlich befunden, als daß sie diese Reaktion hätten nachweisen können. Sowohl die Konzentration von AAA als auch deren höhere Affinität zu pHSA seien alleine ausschlaggebend für die Agglutination von beschichteten Erythrozyten.

Der HBsAg assoziierte pHSA-Rezeptor konnte in unseren Untersuchungen nachgewiesen werden. Von den insgesamt 88 HBsAg-Trägern wiesen 38 Seren eine pHSA-Bindungsfähigkeit auf. Eine deutlich positive Korrelation zwischen dem Auftreten von pHSA-Bindungsaktivität und dem Vorhandensein von HBeAg im Serum ergab sich aus den Experimenten, während anti-HBe-positive Seren, wie die Abb. 15 zeigt, in der Mehrzahl der Fälle keine oder nur mäßige Aktivitäten hatten.

Dieses unterschiedliche Reaktionsmuster bei HBeAg-positiven Seren einerseits und anti-HBe-positiven andererseits, wird in der Literatur gleichfalls beschrieben. So bestätigten Untersuchungen von Neurath und Strick, 1979 b, diese Beobachtung im RIA. Auch Imai et al., 1979, wiesen auf den HBsAg-Partikeln, die man von HBeAg-positiven, asymptomatischen HBV-Trägern isoliert hatte, einen Rezeptor für pHSA nach, fanden aber im Gegensatz keinen HBsAg assoziierten Rezeptor für pHSA bei solchen Partikeln, die sie von anti-HBe-positiven Trägern gewonnen hatten. Imai fand eine gewisse Überlappung in den Hämagglutinations-Titern zwischen den beiden Gruppen. Dieser Übergangsbereich, der bei ihm im Bereich von Titerstufe $\log_2 T = 5$ bis 7 lag, war in unserer Untersuchung stärker ausgeprägt. So gab es zum einen HBeAg-positive Seren mit einem Hämagglutinations-Titer von $\log_2 T = 2$, zum anderen aber auch anti-HBe-positive Patientenserum, die deutlich bis zur Titerstufe $\log_2 T = 8$ reagierten. Pontisso et al., 1983, beobachteten ebenfalls das Auftreten von pHSA-Rezeptoren bei anti-HBe-positiven Fällen und erklärten dieses mit den geringen Spiegeln von aktiven Replikationsvorgängen, die unter Umständen trotz der Anwesenheit von anti-HBe im Serum stattfänden.

Ob quantitative oder qualitative Unterschiede im Bezug auf das HBsAg-Partikel für das Ausmaß der Hämagglutination verantwortlich sind, ist noch Gegenstand der Diskussion. Daß die pHSA-Bindungsaktivität in HBeAg-positiven Seren durch die Anwesenheit von Rezeptoren auf dem HBeAg bedingt sei, konnte bisher nicht belegt werden. Eine zu diskutierende Korrelation zwischen der HBsAg-Konzentration und dem Hämagglutinations-Titer muß aufgrund eines Experimentes von Millich et al., 1981, in Frage gestellt werden. Sie äquilibrierten Patientenserum hinsichtlich des HBsAg-Titers und überprüften anschließend ihre pHSA-Bindungs-fähigkeit. Es wurde dennoch eine unterschiedliche Bindungsaktivität zwischen HBeAg-positiven und HBeAg-negativen Seren beobachtet. Für einen qualitativen Unterschied des HBsAg von HBeAg-positiven und anti-HBe-positiven Seren sprach sehr die Beobachtung von Imai et al., 1979, daß solche Partikel mit Rezeptor eine höhere Dichte hatten als diejenigen ohne den Rezeptor; außerdem verlor das HBsAg nach Pronasebehandlung seinen Rezeptor und wurde in der spezifischen Dichte leichter. Millich et al., 1981 a und b, glaubten, daß C1q am HBsAg-Partikel gebunden ist und somit hier als die pHSA-Bindungsstelle fungiert.

Die Spezies-Spezifität des Rezeptors konnte in der passiven Hämagglutination von uns bestätigt werden. Alle rezeptorbedingten Reaktionen durch HBsAg-positive Seren, waren nur mit pHSA, nicht jedoch mit mHSA oder pBSA inhibierbar. Einen indirekten Nachweis, daß die Albumin-Bindungsaktivität für das HBsAg spezies-spezifisch ist, erfolgte durch Gegenüberstellung der mittleren Hämagglutinations-Titer mit pHSA und pBSA beschichteten roten Blutkörperchen. Während bei HBsAg-negativen Seren kein oder nur ein geringer Unterschied zu verzeichnen war, fielen dem gegenüber die signifikant unterschiedlichen Titer der HBsAg-positiven Seren auf (siehe Abb. 14). Daß der auf dem HBsAg exprimierte Rezeptor nur mit pHSA reagiert, wurde von zahlreichen Untersuchern überprüft und bestätigt. Es wurde vermutet, daß damit auch die Wirtsbezogenheit des Hepatitis-B-Virus erklärt werden kann (Imai et al., 1979; Thung und Gerber, 1981 b und c; Trevisan et al., 1982).

Die Untersuchungen mit der Immundiffusion wiesen auf eine geringe pHSA-Bindungsaktivität auch bei Normalpersonen hin. Mit dem Auftreten von 2-3% lag sie in unseren Versuchen in der Größenordnung anderer Autoren (Lenkel et al., 1977 a).

Deutlich höhere Incidenz von pHSA-Bindung wurden im Gegensatz zum Kontrollkollektiv bei den 298 Seren von Patienten mit Lebererkrankungen gefunden. Von diesen Seren des Patientenkollektivs I reagierten 87 (= 29,2%) positiv in der Immundiffusion. Besonders häufig war die Ausbildung von Präzipitationsbänden bei Patienten mit Lebercirrhose (46,3%), chronisch aktiver Hepatitis (32,3%) und akuter Hepatitis (27,3%) zu finden. Lenkel et al., 1977 c, beschrieben eine gute Übereinstimmung zwischen dem Vorkommen von AAA gemessen durch die Immundiffusion bzw. Hämagglutination bei Patientenserum mit akuten Virushepatitiden und chronisch aktiven Hepatitiden, während sogenannte gesunde HBsAg-Träger und Cirrhosepatienten eine Ausnahme bildeten. Cirrhosen seien bei geringen Hämagglutinations-Titern mit hohen Werten in der Immundiffusion gekoppelt. Bei HBsAg-positiven Seren würde hingegen die umgekehrte Situation beobachtet werden, nämlich hohe Agglutinations-Titer mit niedrigen Immundiffusions-Werten. Es wurde deshalb diskutiert, ob ein allein positiv ausgefallener Immundiffusions-Test mit ausgeprägten chronischen Lebererkrankungen korreliert, das heißt mit einer deutlich eingeschränkten Leberzellfunktion, während isoliert hohe Hämagglutinations-Titer solche HBsAg-Träger kennzeichnet, die keine ausgeprägte Leberzerstörung besitzen.

Eine Korrelation zwischen Hämagglutinations-Titer und Titer in der Immundiffusion zu überprüfen schien für uns nicht sinnvoll, da wir in der passiven Hämagglutination wohl ausschließlich nur den Rezeptor nachweisen konnten, jedoch keine AAA.

Wie Lenkel, 1980 a, berichtete, schien der Immundiffusions-Test davon abhängig zu sein, ob frisch gewonnenes Patientenserum verwendet wurde. Sowohl der Einfrierungs- und Auftauungsprozeß, sowie die Lagerung für mehr als sieben Tage bei 4°C sollten einen Abfall des Präzipitations-Titers bewirken.

Es stellte sich bei unseren Untersuchungen tatsächlich heraus, daß die Incidenz einer positiven Immundiffusion des PK II höher lag als bei PK I. Während im ersten Kollektiv, wie oben beschrieben, nur insgesamt 29,2% positiv reagierten, fand sich bei PK II eine Häufigkeit von 73,9%. Präzipitationsbanden erschienen nun in einer Häufigkeit von 100% bei Cirrhosen, bei CAH von 78,8% und bei AVH von 70,4%. Eine Lagerung bei -20°C könnte deshalb unter Umständen doch eine Auswirkung auf Incidenz und den Präzipitations-Titer haben, wie es Lenkel, 1980 a, beschrieb. Möglicherweise kommt es bei Lagerung zur Spontanaggregation von Albuminmolekülen zu pHSA, das dann mit AAA Immunkomplexe ausbildet. Die AAA sind danach eventuell nicht mehr nachweisbar. Eine weitere Klärung dieser Frage würden Experimente bringen, bei denen dasselbe Patientenkollektiv direkt nach Serumabnahme und nach längerer Lagerung bei -20°C untersucht würde.

Aus Abb. 18 und 19 wird deutlich, daß die Patientenseren in der Immundiffusion sowohl mit dem polymeren humanen Albumin (pHSA), als auch mit pBSA reagieren, nicht jedoch mit den beiden Monomeren von HSA und BSA. Hier bestätigt sich die Kreuzreaktion von AAA, wie sie schon früher von anderen Autoren aufgezeigt wurde (Lenkel et al., 1980 b; Thung und Gerber, 1981 b).

Ob das Phänomen der Immunpräzipitation mit pHSA und pBSA bei Patientenseren für Lebererkrankungen spezifisch ist, war strittig. Lenkel, 1980 a, beobachtete eine höhere Incidenz von positiver Immundiffusion auch bei nicht hepatischen Erkrankungen wie z.B. LED oder RA. Diese Reaktion wurde jedoch wiederum auf eine bei diesen Erkrankungen bestehende subklinische Lebererkrankung zurückgeführt. So war bei allen Seren mit RA die AAA-Präzipitation mit einer hohen Incidenz von AMA assoziiert. Auch Walker und Doniach, 1970 beschrieben eine subklinische Lebererkrankung bei AMA-positiven Patienten mit Kollagenerkrankungen. Von uns konnte die Polyalbumin-Bindungsaktivität gleichfalls bei solchen Autoimmunerkrankungen bestätigt werden. Es reagierten Seren von LED (37,0%), GN (5,9%), FNHI (43,7%), aber vor allem RA (71,9%) positiv. Diese Autoimmunerkrankungen zeigten

wie die Patientenserum mit hepatischen Erkrankungen eine Kreuzreaktion mit homologen und heterologen polymeren Albuminen (pHSA, pBSA).

Das Auftreten von AAA bei nicht hepatischen Erkrankungen ließ auch an die Möglichkeit denken, daß es sich bei ihrem Erscheinen um das sekundäre Phänomen eines Immunregulationsdefektes handeln könnte und weniger um eine für Leberdysfunktion charakteristische Erscheinung. Die vorliegenden Untersuchungen unterstützen nicht die von Lenkel, 1980 a, vertretene Ansicht, daß AAA spezifisch für Lebererkrankungen sei und daß ihre Entstehung nur durch eine Leberzellnekrose verursacht werden könne. Zumindest bei nicht hepatischen Immunerkrankungen wie LED, GN, FNHI und RA entstehen sie nicht durch diesen Mechanismus. Diese Ansicht wird umso mehr dadurch gestützt, daß AAA bei Leberentzündungen erst bei erheblicher Leberzellfunktionseinschränkung auftreten sollen. Damit erscheint das Auftreten von AAA bei subklinischen Begleiterkrankungen der Leber eher unwahrscheinlich zu sein. Das Erscheinen von AAA bei nicht hepatischen Immunerkrankungen kann somit nicht Folge einer begleitenden subklinischen Leberentzündung sein. Die fehlende Korrelation zwischen der Höhe der SGPT als empfindlicher Parameter einer Lebererkrankung und dem Präzipitations-Titer stellt die Leberspezifität von AAA ebenfalls in Frage. Demgegenüber weist die positive Korrelation zwischen der Höhe der Gamma-Globuline und dem Präzipitations-Titer ($p = 0,002$) unter Umständen auf eine Stimulation des Immunsystems hin, die gehäuft bei Lebererkrankungen, aber auch bei nicht hepatischen Immunerkrankungen auftritt und möglicherweise unterschiedlicher Genese ist. Das Auftreten von AAA ist somit am ehesten ein Epiphänomen, das krankheitsunspezifisch, durch einen Immunregulationsdefekt bedingt, vorkommen kann. Unabhängig von ihrer Genese sind AAA in der Lage mit der Interaktion zwischen Hepatitis-B-Virus, pHSA-Molekülen und den pHSA-Rezeptoren auf der Hepatozytenoberfläche zu interferieren. Darüberhinaus können AAA mitverantwortlich sein für in vivo an Hepatozyten gebundenes Immunglobulin. Letztlich können AAA durch

Ihre in vivo Reaktion mit pHSA deren Katabolismus durch Hepatozyten beeinflussen.

Die dargestellten Untersuchungen konnten nicht klären, weshalb passive Hämagglutination und Immundiffusion jeweils vornehmlich HBsAg assoziierte Rezeptoren bzw. AAA erfassen. Bei der passiven Hämagglutination erfolgt die Polymerisation der Albumine durch Glutaraldehyd gleichzeitig während der Beschichtung der Erythrozyten. Bei der Immundiffusion werden dagegen zuvor gereinigtes pHSA oder pBSA verwendet. Der unterschiedliche Polymerisationsprozeß kann zur unterschiedlichen Expression von pHSA-Determinanten führen. Die durchgeführten Untersuchungen bestätigen die unabhängige Existenz von spezie-spezifischen HBsAg assoziierten Rezeptoren für pHSA und von zirkulierenden Autoantikörpern gegen pHSA. Aufgabe zukünftiger Untersuchungen ist es, sensiblere und spezifischere Testsysteme wie Radioimmunoassay und Enzymimmunoassay zum Nachweis von AAA aufzubauen, um dann die mögliche pathogenetische Bedeutung dieser AAA in funktionellen Studien untersuchen zu können.

5. Zusammenfassung

1. Mit Hilfe der passiven Hämagglutination und der Immundiffusion nach Ouchterlony wurde die pHSA-Bindungsaktivität von Normal- und Patientenseren untersucht. Es sollte die Existenz von AAA unabhängig vom HBsAg assoziierten pHSA-Rezeptor überprüft und gegebenenfalls eine Aussage hinsichtlich ihrer Spezifität für Lebererkrankungen getroffen werden. Dazu wurden a) Seren von Patienten mit Lebererkrankungen sowohl nach Lagerung bei -20°C , als auch Seren frisch nach Blutentnahme und b) Seren von Patienten mit nicht hepatischen Immunerkrankungen getestet. Ferner wurde im Tierversuch überprüft, ob durch Immunisierung mit polymeren Albuminen Antikörper erzeugt werden können, die nur mit polymerspezifischen Determinanten reagieren.
2. Durch die Immunisierung von Kaninchen mit polymeren und monomeren Albuminen konnten Antikörper erzeugt werden, die mit der sogenannten "Haptenic"- und "Struktur"-Determinante reagierten. Eine spezies-kreuzreagierende polymerspezifische Determinante konnte mit den durch Kurzzeitimmunisierung gewonnenen Antiseren nicht sicher nachgewiesen werden. Autoantikörper konnten bei den Präseren der Kaninchen nicht festgestellt werden.
3. Die passive Hämagglutination zeigte bei allen Patientenseren der Kontrollgruppe I und II einen geringen Titer. Die obere Grenze der Reaktion von Normalseren mit pHSA wurde durch den mittleren Titer aller Kontrollseren I zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung mit $\log_2 T = 5,13$ festgelegt.
4. Der HBsAg assoziierte Rezeptor konnte durch die passive Hämagglutination nachgewiesen werden. Eine deutliche Korrelation zwischen erhöhter pHSA-Bindungsaktivität und dem Vorhandensein von HBsAg im Serum konnte beobachtet werden, während anti-HBe-positive Seren nur mäßige Aktivitäten zeigten ($p < 0,0005$). Der HBsAg assoziierte Rezeptor wurde als spezies-spezifisch bestätigt.
5. Es konnte kein Nachweis für die Existenz von AAA durch die passive Hämagglutination geführt werden. Sechs HBsAg-negative Seren reagierten mit erhöhtem Titer. Die fehlende Inhibition durch

pHSA und pBSA läßt eine unspezifische nicht durch Autoantikörper bedingte Reaktion bei diesen Seren vermuten.

6. Die Immundiffusion wies auf eine geringe Häufigkeit von pHSA-Bindungsaktivität zwischen 2 und 3% bei Normalseren hin. Seren von Patienten mit Lebererkrankungen reagierten nach Lagerung bei -20°C zu 29,2% positiv in der Immundiffusion. Die Reaktion war nicht spezies-spezifisch. Eine höhere Incidenz von 73,9% war bei den frisch nach Blutentnahme getesteten Seren zu verzeichnen.
7. Auch Seren von Patienten mit nicht hepatischen Immunerkrankungen reagierten mit pHSA und pBSA (LED 37,0%; GN 5,9%; PNHI 43,7%; RA 71,9%) in der Immundiffusion.
8. Keine Korrelation zwischen der Höhe der SGPT und dem Präzipitations-Titer konnte beobachtet werden. Eine positive Korrelation zeigte sich dagegen zwischen der Höhe der Gamma-Globuline und dem Präzipitations-Titer ($p = 0,002$).
Das Auftreten von AAA ist deshalb keine für Leberdysfunktion charakteristische Erscheinung, sondern eher das sekundäre Phänomen eines Immunregulationsdefektes.

6. Liste der Abkürzungen

AAA	Anti-Albumin-Antikörper
alk.-tox.	alkohol-toxisch
AMA	Anti-mitochondriale Antikörper
ANA	Anti-nukleäre Antikörper
anti-HAV	Antikörper gegen das Hepatitis-A-Virus
anti-HBc	Antikörper gegen das HBc-Antigen des Hepatitis-B-Virus
anti-HBe	Antikörper gegen das HBe-Antigen des Hepatitis-B-Virus
anti-HBs	Antikörper gegen das Oberflächenantigen des Hepatitis-B-Virus
autoim.	autoimmun
AVH	akute Virus-Hepatitis
BSA	kommerziell erhältliches Rinderserumalbumin
CAH	chronisch aktive Hepatitis
Ch	extrahepatische Cholestase
Ci	Cirrhose
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
FL	Fettleber
GN	Glomerulonephritis
GT	sogenannter gesunder HBsAg-Träger
HAV	Hepatitis-A-Virus
HBcAg	HBc-Antigen des Hepatitis-B-Virus
HBeAg	HBe-Antigen des Hepatitis-B-Virus
HBsAg	Oberflächenantigen des Hepatitis-B-Virus
HBV	Hepatitis-B-Virus
HSA	kommerziell erhältliches Humanserumalbumin
KG I/II	Kontrollgruppe I/II
LED	Lupus erythematoses disseminatus
MAK	Antikörper gegen mikrosomales Antigen der Schilddrüse
mBSA	monomeres Rinderserumalbumin
mHSA	monomeres Humanserumalbumin
NANB	nicht-A nicht-B Hepatitis
NKS	normales Kaninchenserum

Liste der Abkürzungen (Fort)

PBC	primäre biliäre Cirrhose
pBSA	polymeres Rinderserumalbumin
pHSA	polymeres Humanserumalbumin
p.NANB	protrahierte nicht-A nicht-B Hepatitis
PNHI	primär nicht hepatische Immunerkrankungen
pRSA	polymeres Kaninchenserumalbumin
RA	rheumatoide Arthritis
RIA	Radioimmuno assay
rpm	Umdrehungen pro Minute
SGPT	Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase
SMA	Antikörper gegen glatte Muskulatur
TAK	Antikörper gegen Thyreoglobulin der Schilddrüse
TP	toxischer Leberparenchymschaden
u.G.	unbekannter Genese

7. Literaturverzeichnis

BOYDEN, S.V.

The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera.
J. Exp. Med. 93 (1951) 107 - 120

DE GROOTE, J., DESMET, V.J., GEDIGK, K.P. and KORB, G.

A classification of chronic hepatitis.
Lancet 2 (1968) 626 - 628

GHEITIE, V., ONICA, D., LENKEI, R. and MARGINEANU, I.

An immunological hypothesis for plasma protein catabolism.
Mech. Ageing Dev. 17 (1981) 27 - 39

HANSSON, B.G. and PURCELL, R.H.

Sites that bind polymerized albumin on hepatitis B surface antigen particles: Detection by radioimmunoassay.
Infect. Immun. 26 (1979) 125 - 130

HAUPTMAN, S. and TOMASI, T.B.

Antibodies to albumin in cirrhotic sera.
J. Clin. Invest. 54 (1974) 122 - 127

HOLLINGER, F.B. and DREESMAN, G.R.

Hepatitis B virus antigens and albumin receptors.
Gastroenterology 76 (1979) 641 - 643

IMAI, M., YANASE, Y., NOJIRI, T., MIYAKAWA, Y. and MAYUMI, M.

A receptor for polymerized human and chimpanzee albumins on hepatitis B virus particles co-occurring with HBsAg.
Gastroenterology 76 (1979) 242 - 247

LEMIEUX, S., AVRAMEAS, S. and BUSSARD, A.E.

Local hemolysis plaque assay using a new method of coupling antigens on sheep erythrocytes by glutaraldehyde.
Immunochem. 11 (1974) 261 - 269

LENKEI, R., MOTA, G., DAN, M.-E., and LAKY, M.

The polymerized albumin and anti-albumin-antibodies in patients with hepatic diseases.
Rev. roum. Biochim. 11 (1974) 271 - 276

LENKEI, R., BABES, V.T., DAN, M.-E. and MUSTEA, A.

Correlations between anti-albumin antibodies and HBsAg in hepatic patients.

J. Med. Virol. 1 (1977 a) 29 - 34

LENKEI, R., ONICA, D. and GHETIE, V.

Receptors for polymerized albumin on liver cells.

Experientia 33 (1977 b) 1046 - 1047

LENKEI, R. and GHETIE, V.

Methods for detection of anti-albumin autoantibodies in hepatic diseases.

J. Immunol. Methods 16 (1977 c) 23 - 30

LENKEI, R., BABES, V.T., MUSTEA, A. and DOBRE, I.

Deeper insight into HBsAg - anti-albumin antibody correlations.

J. Med. Virol. 4 (1979) 137 - 145

LENKEI, R.

A new antigen/antibody system - the polymerized albumin and antialbumin antibodies.

Rev. Roum. Med. 18 (1980 a) 129 - 147

LENKEI, R., GHETIE, V., MOGOS, A. and GHYKA, P.

Antialbumin agglutinins in HBsAg-negative hepatic patients.

Gastroenterology 79 (1980 b) 776 - 777

LENKEI, R., OULIGESCU, L., BELASCU, I., POSPAI, D. and DOBRE, I.

Anti-albumin antibodies in chronic liver diseases:

Diagnostic significance of these antibodies in patients with conventional or immunosuppressive therapy.

Clin. Exp. Immunol. 43 (1981) 381 - 389

LOURY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J.

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193 (1951) 265 - 275

MACHIDA, A., KISHIMOTO, S., OHNUMA, H. and MIYAMOTO, H.

A hepatitis B surface antigen polypeptide (P 31) with the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins.

Gastroenterology 85 (1983) 268 - 274

MARGINEANU, I., MEDESAN, C. and ONICA, D.

Anti-albumin antibodies in normal rabbit sera.

Immunology Letters 6 (1983) 45 - 50

MATUHASHI, T. and HOSOKAWA, Z.

Reactants to human serum albumin-coated red cells found
in Au(1)-positive sera.

Jap. J. Exp. Med. 42 (1972) 183 - 185

MAYUMI, M., IMAI, M. and MIYAKAWA, Y.

HBsAg particles with and without a receptor for polymerized
albumin.

Gastroenterology 77 (1979) 203

MICHALAK, T., KRAWCZYNSKI, K., OSTROWSKI, J. and NOWOSLAWSKI, A.

Hepatitis B surface antigen and albumin in human hepatocytes.

Gastroenterology 79 (1980) 1151 - 1158

MIHAESCU, S., LENKEI, R. and GHETIE, V.

Radioimmunoassay of anti-albumin antibodies in human sera.

J. Immunol. Methods 42 (1981) 187 - 193

MILICH, D.R., PAPAS, E. and VYAS, G.N.

Polymerized human albumin binding reactivity in hepatic
disease.

Gastroenterology 79 (1980) 1116

MILICH, D.R., PAPAS, E., BHATNAGAR, P.K. and VYAS, G.N.

Interactions between polymerized human albumin, hepatitis B
surface antigen, and complement: I. Binding of polyalbumin
to C1q.

J. Med. Virol. 7 (1981 a) 181 - 192

MILICH, D.R., BHATNAGAR, P.K., PAPAS, E. and VYAS, G.N.

Interactions between polymerized human albumin, hepatitis B
surface antigen, and complement: II. Involvement of C1q in
or near the hepatitis B surface antigen receptor for polyalbumin.

J. Med. Virol. 7 (1981 b) 193 - 204

MILICH, D.R., GOTTFRIED, T.D. and VYAS, G.N.

Characterization of the interaction between polymerized human albumin and hepatitis B surface antigen.

Gastroenterology 81 (1981 c) 218 - 225

NEURATH, A.R., FRINCE, A.M. and LIPPIN, A.

Hepatitis B antigen: Antigenic sites related to human serum proteins revealed by affinity chromatography.

Immunology 71 (1974) 2663 - 2667

NEURATH, A.R. and STRICK, N.

Affinity chromatography of hepatitis B surface antigen from e-antigen-positive sera on insolubilized cross-linked albumin.

Arch. Virol. 60 (1979 a) 79 - 81

NEURATH, A.R. and STRICK, N.

Radioimmunoassay for albumin-binding sites associated with HBsAg: Correlation of results with the presence of e-antigen in serum.

Intervirology 11 (1979 b) 128 - 132

O'NEILL, S.P.

Interaction of hepatitis B surface antigen with polymerized human serum albumin.

J. Med. Virol. 4 (1979) 177 - 185

ONICA, D., LENKEI, R. and GHETIE, V.

Immunogenicity of glutaraldehyde-treated homologous albumin in rabbits.

Immunochem. 15 (1978 a) 687 - 693

ONICA, D., DOBRE, M.-A. and LENKEI, R.

Immunogenicity of glutaraldehyde-treated homologous monomeric albumin in rabbits.

Immunochem. 15 (1978 b) 941 - 944

ONICA, D., MARGINEANU, I. and DOBRE, M.-A.

Antigenic specificity of glutaraldehyde-treated rabbit albumin.

Mol. Immunol. 17 (1980) 783 - 789

ONICA, D., MARGINEANU, I. and LENKEI, R.

Specificity of anti-albumin antibodies in liver diseases.

Mol. Immunol. 18 (1981) 807 - 813

ONICA, D., MARGINEANU, I., MEDESAN, G., CALUGARU, A. and MANCIULEA, M.

Antibodies against glutaraldehyde-modified albumin in normal mouse sera.

Mol. Immunol. 19 (1982) 1021 - 1027

ONICA, D., MIHAESCU, S., ZAMFIR, G. and BARAC, D.

C1q has albumin binding activity but does not interfere in the hemagglutination test for anti-albumin antibodies.

J. Immunol. Methods 59 (1983 a) 73 - 82

ONICA, D., CALUGARU, A., MARGINEANU, I., ZAMFIR, G. and BELASCU, I.

Immunochemical characterization of anti-albumin antibodies in liver diseases.

Clin. Immunol. Immunopathol. 26 (1983 b) 223 - 231

DUCHTERLONY, Ö.

Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.

Progr. Allergy 5 (1958) 1 - 78

PONTISSO, P., ALBERTI, A., BORTOLOTTI, F. and REALDI, G.

Virus-associated receptors for polymerized human serum albumin in acute and in chronic hepatitis B virus infection.

Gastroenterology 84 (1983) 220 - 226

SCHEIDEGGER, J.J.

Azocarminfärbung

Int. Arch. Allergy 7 (1955) 103

STEFFEN, C.

Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie.

Stuttgart 1968

THUNG, S.N. and GERBER, M.A.

HbsAg-associated albumin receptors and antialbumin antibodies in sera of patients with liver disease.

Gastroenterology 80 (1981 a) 260 - 264

THUNG, S.N. and GERBER, M.A.

Specificities of albumin receptors and albumin antibodies.

Infect. Immun. 32 (1981 b) 1292 - 1294

THUNG, S.N. and GERBER, M.A.

Presence of receptors for polymerized albumin in HBsAg-containing hepatocytes and hepatoma cell line.

Hepatology 1 (1981 c) 132 - 136

THUNG, S.N. and GERBER, M.A.

Albumin receptors on hepatitis B virus and antibodies to albumin.

Liver 1 (1981 d) 75 - 80

THUNG, S.N. and GERBER, M.A.

Hepatitis B virus and polyalbumin binding sites.

Gastroenterology 85 (1983 a) 466 - 468

THUNG, S.N. and GERBER, M.A.

Albumin binding sites of human hepatocytes

Liver 3 (1983 b) 290 - 294

TREVISAN, A., GUDAT, F., GUGGENHEIM, R. et al.

Demonstration of albumin receptors on isolated human hepatocytes by light and scanning electron microscopy.

Hepatology 2 (1982) 832 - 835

WALKER, J.G., DONIACH, D. and Doniach, I.

Mitochondrial antibodies in subclinical liver disease.

Quart. J. Med. 39 (1970) 31

LEBENS LAUF

Am 20. März 1954 wurde ich, Markus Müller, als Sohn des Stud.Dir. i.R. Dr. Karl Müller und dessen Ehefrau Anni, geb. Lenhart, in Mainz geboren. Nach dem vierten Volksschuljahr besuchte ich das Neusprachliche Gymnasium Theresianum in Mainz. Im Sommer 1970 wechselte ich zum Willigis-Gymnasium Mainz, an dem ich am 14.5.1973 die Reifeprüfung ablegte.

Am 1.7.1973 wurde ich für 15 Monate zum Wehrdienst eingezogen.

Ab dem Wintersemester 1974/75 studierte ich an der Universität Mainz vier Semester Physik Diplom.

Am 1.11.1976 begann ich eine Lehre als Augenoptiker bei Herrn R.Cadenbach, Koblenz. Die Gehilfenprüfung legte ich am 3.3.1979 mit Erfolg ab.

Anschließend nahm ich zu Beginn des Sommersemesters 1979 an der Universität Mainz das Studium der Medizin auf.

Im April 1985 legte ich das 3. medizinische Staatsexamen ab. Die Approbation zum Arzt erhielt ich am 30.4.1985.

Ab 1.5.1985 begann ich meine Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universitäts Augenklinik, Gießen.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Herr Prof. Dr. Dr. K.-H. Meyer zum Büschenfelde überließ mir freundlicherweise das Thema und stellte mir den erforderlichen Laborplatz zur Verfügung.

Herrn Dr. M. Manns danke ich nicht nur für seine hilfsbereite Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche, sondern auch für seine wertvollen Anregungen.

Frau U. Dang stand mir bei der technischen Durchführung bereitwillig zur Seite.

Schließlich danke ich auch Frau Dipl. med. Inf. A. Kuhnert vom Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation für ihre freundliche Beratung.

